

REC'D 12 SEP 2000

WIPO

PCT

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 ASAHI-2	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04122	国際出願日 (日.月.年) 30.07.99	優先日 (日.月.年) 31.07.98
国際特許分類 (IPC) Int.Cl ¹ C07K 16/12, C12P 21/08, C12N 15/00, C12Q 1/04, G01N 33/53		
出願人 (氏名又は名称) 旭化成工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 30.07.99	国際予備審査報告を作成した日 25.04.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 齋藤 真由美	4B 8931
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	3, 5, 7-13	有
	請求の範囲	1, 2, 4, 6	無
進歩性(IS)	請求の範囲	5, 8	有
	請求の範囲	1-4, 6, 7, 9-13	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-13	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

<請求項5, 8に記載の発明について>

請求の範囲5, 8に記載された発明は国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、かつ、それらの文献の記載を組み合わせることにより当業者にとって容易に発明できたものでもない。

<請求項1, 2, 4, 6に記載の発明について>

本願出願人は答弁書において、引用文献1にはStreptococcus pneumoniaeのRibosomal Protein L7/L12に対する抗体が記載されているものの、これはStreptococcus pneumoniaeにのみ特異的に反応する抗体ではなく、Streptococcus属の他の種、Straphylococcus属、Haemophilus属等他の微生物にも反応していること、それに対し請求項1記載の本願発明は、微生物のリボソーム蛋白質に対する抗体であり、当該微生物に特異的に反応する抗体である点で、引用文献1に記載の抗体とは相違する旨主張している。しかしながら、本願請求項1に記載の抗体が特異的に反応するのは、「微生物」のリボソーム蛋白質としか特定されておらず、その「微生物」についての特定は何らなされていない。ということは、請求項1に記載の抗体が特異的に反応するのは、「任意の属・種に属する微生物」由来のリボソーム蛋白質と認められる。

したならば、引用文献1記載の抗体は、Streptococcus pneumoniaeのRibosomal Protein L7/L12に特異的に反応する抗体ではなく、Streptococcus属の他の種、Straphylococcus属、Haemophilus属等他の微生物のRibosomal Protein L7/L12にも反応していることから、「微生物」のリボソーム蛋白質(Ribosomal Protein L7/L12)に特異的に反応する抗体に含まれるものと認める。

したがって、請求項1の記載のままでは、依然として引用文献1記載の発明と同一と言わざるを得ない。請求項2, 4, 6記載の発明についても、同じ根拠から同じ拒絶理由があると認める。

<請求項3, 7に記載の発明について>

本願出願人は答弁書において、引用文献3にはNeisseria gonorrhoeaeの「精製リボソーム画分」に対する抗体が記載されているが、この「精製リボソーム画分」とはRNA:蛋白質の比が2:14というものであり、Neisseria gonorrhoeaeの「リボソーム蛋白質」に対する抗体は記載も示唆もされていない、加えてNeisseria gonorrhoeaeの「種あるいは属に特異的」な抗体であるか否かは全く記載されていない、したがって引用文献1, 3記載の発明を組み合わせても、請求項3, 7に記載の本願発明を容易に想到し得ない旨主張している。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

しかしながら、本願請求項 3, 7 に記載の本願発明は、STD 原因微生物である *Neisseria gonorrhoeae* の「リボソーム蛋白質」に対する抗体である (請求項 1 を引用しているのだ)。

出願人が上述して指摘しているように、この「精製リボソーム画分」は RNA : 蛋白質の比が 2:14 という蛋白質の方が圧倒的に多いのであれば、該「精製リボソーム画分」に対する抗体は「リボソーム蛋白質」に対する抗体である蓋然性が高い。したがって、引用文献 3 には、*Neisseria gonorrhoeae* の「リボソーム蛋白質」に対する抗体が記載されていると認める。(ちなみに、該抗体が *Neisseria gonorrhoeae* の属・種に特異的であるかどうかは、引用文献 3 の記載からは分からない。)

そもそも、抗原抗体反応を利用して抗原を検出をしようとする際、特に感染症原因微生物の検出等においては、該微生物の属・種に特異的に反応する抗体を得ることは、本願出願当時周知の課題であり、そのために得られた種々の抗体をスクリーニングを行い、特定の属・種の微生物由来の蛋白質に対する抗体を得る方法は、周知技術であったと認める。

したならば、STD 原因微生物である *Neisseria gonorrhoeae* の検出を特異的にする目的で、引用文献 3 記載の発明に対し、上記周知の課題及び周知技術を適用し、*Neisseria gonorrhoeae* のリボソーム蛋白質に対する特異的抗体を得ることは、当業者が容易に想到し得たことと認める。

<請求項 9-13 に記載の発明について>

本願出願人は答弁書において、引用文献 4 には STD 原因微生物の抗原に示威する抗体、その製造方法、該抗体を用いることによる該微生物の検出方法が記載されているものの検出用試薬キットは記載されておらず、また抗体製造方法で用いている免疫原は TWAR 生物自体であり蛋白質又は部分ペプチドを免疫原としていない旨主張している。

しかしながら、本願出願当時の技術常識を勘案すれば、抗体を用いた微生物の検出方法が記載されていれば、該検出方法で用いるキットは開示されていると認めて差し支えないと考えられる。また、抗原として微生物自体を用いていようが、本願出願当時の技術常識を勘案すれば、抗原として微生物自体のみならず該微生物由来蛋白質を用いられると当然考えられたと認める。

したがって、呼吸器系感染症微生物や STD 原因微生物を検出する目的で、(本願出願当時の技術常識を勘案して) 引用文献 4 に開示されている発明にたおいて、感染症原因微生物に対する抗体として、引用文献 1 記載の抗体又は引用文献 1, 3 記載の発明に基づいて得られる抗体を用いることも、当業者が容易に想到し得たことと認める。

PATENT COOPERATION TREATY
P C T
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference ASAHI-2		FOR FURTHER ACTION See Notification of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. P C T / J P 99 / 04122	International filing date (day/month/year) 30.07.99	Priority date (day/month/year) 31.07.98	
International Patent Classification (IPC) I n t . C l C 07K 16/12, C12P 21/08, C12N 15/00, C12Q 1/04, G01N 33/53			
Applicant ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA			

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consists of a total of _____ pages.</p>
<p>3. This report contains indications and corresponding pages relating to the following items :</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ;</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of Submission of the demand 30.07.99	Date of completion of this report 25.04.00
Name and address Japanese Patent Office (IPEA/JP) 4-3 Kasumigaseki 3-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915	Examiner (Authorized Officer) MAYUMI SAITO Tel : 03-3581-1101 ext. : 3448

Form PCT/IPEA/409 (Cover Sheet) (July 1998)

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

Intern. Application No.
P C T / J P 99 / 04122

1 . Basis of the opinion

1. With regard to the elements of the international application :

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description, pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims Nos. _____, as originally filed
Nos. _____, as amended under Article 19
Nos. _____, filed with the demand
Nos. _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings, pages / fig. _____, as originally filed
pages / fig. _____, filed with the demand
pages / fig. _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description, pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language which is :

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ The language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, was on the basis of the sequence listing :

- ☐ Contained in the international application in written form.
- ☒ Filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ Furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ Furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of :

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, pages / fig. _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosures as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2©).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

Intern. Application No.

P C T / J P 99 / 04122

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ; citations and explanations supporting such statement

1. STATEMENT

Novelty (N)	Claims <u>3, 5, 7 - 13</u>	YES
	Claims <u>1, 2, 4, 6</u>	NO
Inventive Step (IS)	Claims <u>5, 8</u>	YES
	Claims <u>1 - 4, 6, 7, 9 - 13</u>	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims <u>1 - 13</u>	YES
	Claims <u></u>	NO

2. CITATIONS AND EXPLANATIONS (Rule 70.7)

<Invention described in claims 5 and 8>

The inventions described in claims 5 and 8 are not disclosed in the references listed in the international search report nor in the references which are admitted to be relevant to the said inventions. The inventions cannot be invented easily by a skilled man in the art by combining the descriptions in those references.

<Inventions described in claims 1, 2, 4 and 6>

Applicant argues in the Response that though reference 1 discloses an antibody to Ribosomal Protein L7/L12 of *Streptococcus pneumoniae*, this is not an antibody which reacts specifically to *Streptococcus pneumoniae*, and reacts to the other species of genus *Streptococcus*, genus *Straphylocpocus*, genus *Haemophilus* etc, whereas the invention described in claim 1 of the present application is an antibody to Ribosomal Protein and different from the antibody described in reference 1 in that the antibody reacts specifically to said microorganisms. However the substance which the antibody of claim 1 reacts specifically to is only defined as Ribosomal Protein (Ribosomal Protein L7/L12) of "microorganisms". "Microorganisms" in claim 1 is not defined at all. Thus the substance which the antibody of claim 1 reacts specifically to is admitted to be Ribosomal Protein derived from "microorganisms of any genus and species".

Since the antibody of reference 1 does not react specifically to Ribosomal Protein L7/L12 of *Streptococcus pneumoniae* and reacts to Ribosomal Protein L7/L12 of other microorganisms such as other species of *Streptococcus*, genus *Straphylocpocus*, genus *Haemophilus* etc as well, it is admitted to be included in the antibody which reacts specifically to Ribosomal Protein L7/L12 of "microorganisms".

Accordingly the invention of claim 1 as it is, is still same with the invention of reference 1. Claims 2, 4 and 6 are rejected based on the same reason in the same

way as claim 1.

<Claims 3, 7>

The applicant argues in the Response that reference 3 discloses an antibody to "purified ribosome fraction" of *Neisseria gonorrhoeae* and this "purified ribosome fraction" consists of RNA and protein whose ratio is 2:14, but does not disclose nor suggest an antibody to "Ribosomal Protein" of *Neisseria gonorrhoeae*. Further reference 3 does not mention at all whether the antibody thereof is specific to "the species or the genus" of *Neisseria gonorrhoeae* or not. Thus the invention described in claims 3 and 7 would not have been obvious to a man skilled in the art over the description of reference 3 in combination with that of reference 1.

However the invention of claims 3 and 7 of the present application is an antibody to "Ribosomal Protein" of *Neisseria gonorrhoeae* which causes a STD (because the claims are dependent to claim 1).

Since the "purified ribosome fraction" of reference 3 has an RNA - protein ratio of 2 : 14, showing that protein is a major constituent of the fraction, as the applicant pointed out, an antibody to said "purified ribosome fraction" is very likely to be an antibody to Ribosomal Protein. Accordingly reference 3 is admitted to disclose an antibody of Ribosomal Protein of *Neisseria gonorrhoeae*. (I note it is unknown from the description of reference 3 if said antibody of reference 3 is specific to the species or genus of *Neisseria gonorrhoeae*.)

To begin with, it was a well known problem at the time of the filing of the present application to obtain an antibody which reacts specifically to the species or genus of microorganisms especially when one attempts to detect said microorganisms which cause infectious diseases utilizing antigen-antibody reaction. Also it was a well known technique to screen various antibodies in order to obtain an antibody which reacts specifically to a protein derived from species or genus of certain microorganisms.

Accordingly a man skilled in the art would easily think of obtaining a specific antibody to Ribosomal Protein of *Neisseria gonorrhoeae* utilizing the above well known problem and technique in order to specifically detect *Neisseria gonorrhoeae* which cause a STD.

<Invention described in claims 9-13>

Applicant argues in the Response that reference 4 discloses an antibody to the antigen of microorganisms which are causative of STD, producing method of the antibody and a method of detecting said microorganisms using the antibody, but not a reagents kit to detect the microorganisms using the antibody, and further the antibody is produced by using an isolated and purified TWAR itself (living creature) as an antigen and not a protein or its partial peptide.

However if we consider the technical common knowledge at the time of the filing of the present application, it is admitted that a disclosure of a method of detecting microorganisms using an antibody is almost same as a disclosure of a reagents kit to detect microorganisms. Also a man skilled in the art would easily think of using a protein or its partial peptide derived from microorganisms instead of microorganisms themselves as an antigen when considering the technical common knowledge at the time of the filing of the present application.

Accordingly in order to detect microorganisms which cause respiratory infectious diseases or STD (when considering the technical common knowledge at the time of the filing of the present application), a man skilled in the art would easily think of using an antibody described in the inventions of references 1-3 as an antibody to microorganisms which cause infectious diseases instead of the antibody disclosed

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 ASAHI-2	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/04122	国際出願日 (日.月.年) 30.07.99	優先日 (日.月.年) 31.07.98
国際特許分類(IPC) Int.Cl ⁷ C07K 16/12, C12P 21/08, C12N 15/00, C12Q 1/04, G01N 33/53		
出願人(氏名又は名称) 旭化成工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 30.07.99	国際予備審査報告を作成した日 25.04.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 齋藤 真由美	4 B 8931
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | | | | |
|--------------------------|------------|---|-------|--------|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> | 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| | 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| | 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | PCT 19条の規定に基づき補正されたもの |
| | 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| | 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| | 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	3, 5, 7-13	有
	請求の範囲	1, 2, 4, 6	無
進歩性(IS)	請求の範囲	5, 8	有
	請求の範囲	1-4, 6, 7, 9-13	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-13	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

〈請求項5, 8に記載の発明について〉

請求の範囲5, 8に記載された発明は国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、かつ、それらの文献の記載を組み合わせることにより当業者にとって容易に発明できたものでもない。

〈請求項1, 2, 4, 6に記載の発明について〉

本願出願人は答弁書において、引用文献1にはStreptococcus pneumoniaeのRibosomal Protein L7/L12に対する抗体が記載されているものの、これはStreptococcus pneumoniaeにのみ特異的に反応する抗体ではなく、Streptococcus属の他の種、Straphylococcus属、Haemophilus属等他の微生物にも反応していること、それに対し請求項1記載の本願発明は、微生物のリボソーム蛋白質に対する抗体であり、当該微生物に特異的に反応する抗体である点で、引用文献1に記載の抗体とは相違する旨主張している。しかしながら、本願請求項1に記載の抗体が特異的に反応するのは、「微生物」のリボソーム蛋白質としか特定されておらず、その「微生物」についての特定は何らなされていない。ということは、請求項1に記載の抗体が特異的に反応するのは、「任意の属・種に属する微生物」由来のリボソーム蛋白質と認められる。

したならば、引用文献1記載の抗体は、Streptococcus pneumoniaeのRibosomal Protein L7/L12に特異的に反応する抗体ではなく、Streptococcus属の他の種、Straphylococcus属、Haemophilus属等他の微生物のRibosomal Protein L7/L12にも反応していることから、「微生物」のリボソーム蛋白質(Ribosomal Protein L7/L12)に特異的に反応する抗体に含まれるものと認める。

したがって、請求項1の記載のままでは、依然として引用文献1記載の発明と同一と言わざるを得ない。請求項2, 4, 6記載の発明についても、同じ根拠から同じ拒絶理由があると認める。

〈請求項3, 7に記載の発明について〉

本願出願人は答弁書において、引用文献3にはNeisseria gonorrhoeaeの「精製リボソーム画分」に対する抗体が記載されているが、この「精製リボソーム画分」とはRNA:蛋白質の比が2:14というものであり、Neisseria gonorrhoeaeの「リボソーム蛋白質」に対する抗体は記載も示唆もされていない、加えてNeisseria gonorrhoeaeの「種あるいは属に特異的」な抗体であるか否かは全く記載されていない、したがって引用文献1, 3記載の発明を組み合わせても、請求項3, 7に記載の本願発明を容易に想到し得ない旨主張している。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

しかしながら、本願請求項 3, 7 に記載の本願発明は、STD 原因微生物である *Neisseria gonorrhoeae* の「リボソーム蛋白質」に対する抗体である (請求項 1 を引用しているのだ)。

出願人が上述して指摘しているように、この「精製リボソーム画分」は RNA : 蛋白質の比が 2:14 という蛋白質の方が圧倒的に多いのであれば、該「精製リボソーム画分」に対する抗体は「リボソーム蛋白質」に対する抗体である蓋然性が高い。したがって、引用文献 3 には、*Neisseria gonorrhoeae* の「リボソーム蛋白質」に対する抗体が記載されていると認める。(ちなみに、該抗体が *Neisseria gonorrhoeae* の属・種に特異的であるかどうかは、引用文献 3 の記載からは分からない。)

そもそも、抗原抗体反応を利用して抗原を検出をしようとする際、特に感染症原因微生物の検出等においては、該微生物の属・種に特異的に反応する抗体を得ることは、本願出願当時周知の課題であり、そのために得られた種々の抗体をスクリーニングを行い、特定の属・種の微生物由来の蛋白質に対する抗体を得る方法は、周知技術であったと認める。

したならば、STD 原因微生物である *Neisseria gonorrhoeae* の検出を特異的にする目的で、引用文献 3 記載の発明に対し、上記周知の課題及び周知技術を適用し、*Neisseria gonorrhoeae* のリボソーム蛋白質に対する特異的抗体を得ることは、当業者が容易に想到し得たことと認める。

<請求項 9 - 13 に記載の発明について>

本願出願人は答弁書において、引用文献 4 には STD 原因微生物の抗原に示威する抗体、その製造方法、該抗体を用いることによる該微生物の検出方法が記載されているものの検出用試薬キットは記載されておらず、また抗体製造方法で用いている免疫原は TWAR 生物自体であり蛋白質又は部分ペプチドを免疫原としていない旨主張している。

しかしながら、本願出願当時の技術常識を勘案すれば、抗体を用いた微生物の検出方法が記載されていれば、該検出方法で用いるキットは開示されていると認めて差し支えないと考えられる。また、抗原として微生物自体を用いていようが、本願出願当時の技術常識を勘案すれば、抗原として微生物自体のみならず該微生物由来蛋白質を用いられると当然考えられたと認める。

したがって、呼吸器系感染症微生物や STD 原因微生物を検出する目的で、(本願出願当時の技術常識を勘案して) 引用文献 4 に開示されている発明にたおいて、感染症原因微生物に対する抗体として、引用文献 1 記載の抗体又は引用文献 1, 3 記載の発明に基づいて得られる抗体を用いることも、当業者が容易に想到し得たことと認める。

Q L

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION (PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 10 February 2000 (10.02.00)	
International application No.: PCT/JP99/04122	Applicant's or agent's file reference: ASAHI-2
International filing date: 30 July 1999 (30.07.99)	Priority date: 31 July 1998 (31.07.98)
Applicant: MATSUYAMA, Kenji et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
30 July 1999 (30.07.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>J. Zahra</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:
FUJINO, Seiya
Mitsuhamma Building
8th floor
2-1, Yotsuya 1-chome
Shinjuku-ku, Tokyo 160-0004
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 10 February 2000 (10.02.00)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference ASAHI-2			
International application No. PCT/JP99/04122	International filing date (day/month/year) 30 July 1999 (30.07.99)	Priority date (day/month/year) 31 July 1998 (31.07.98)	
Applicant ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,CN,EP,IL,JP,KP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
AE,AL,AM,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CU,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,
IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,
SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
10 February 2000 (10.02.00) under No. WO 00/06603

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C07K 16/12, C12P 21/08, C12N 15/00, C12Q 1/04, G01N 33/53	A1	(11) 国際公開番号 WO00/06603 (43) 国際公開日 2000年2月10日(10.02.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04122 (22) 国際出願日 1999年7月30日(30.07.99) (30) 優先権データ 特願平10/230204 1998年7月31日(31.07.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 旭化成工業株式会社 (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒530-8205 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 松山健二(MATSUYAMA, Kenji)[JP/US] コロラド州 ボルダーク バッキンガムロード 5036 Colorado, (US) 白井 孝(SHIRAI, Takashi)[JP/JP] 〒416-0943 静岡県駿東郡長泉町下土狩541-36 Sizuoka, (JP) 江藤高志(ETOH, Takashi)[JP/JP] 〒417-0801 静岡県富士市大淵168-30 Sizuoka, (JP)		(74) 代理人 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160-0004 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: ANTIBODY FOR DETECTING MICROORGANISM (54) 発明の名称 微生物検出用抗体 (57) Abstract An antibody for detecting a microorganism whereby all serotypes of a single species can be detected; a method for constructing this antibody; a method for detecting a microorganism; and reagent kits for detecting a microorganism. Antibodies against the same functional molecules in cells of various microorganisms, particularly ribosomal proteins and still particularly a ribosomal protein L7/L12, are constructed and an antibody reacting specifically with the target microorganism is selected. Then the microorganism is detected by using this antibody. This antibody is useful in industrial drug products, in particular, remedies for infection with microorganisms typified by bacteria.		

明細書

微生物検出用抗体

〔技術分野〕

本発明は、種々の微生物、特に細菌の検出に有用な抗体、それを用いた微生物検出方法、微生物検出用試薬キット及び微生物検出用特異的抗体の作製法に関する。

本発明は、医薬品工業、特に細菌を中心とする微生物感染症のための診断薬の製造に有効に利用される。

〔背景技術〕

微生物感染症の診断は通常感染部位などでの原因菌の検出か、血清、体液中の原因菌に対する抗体の検出により確定される。特に、この診断は原因菌の検出が患者への迅速な治療を可能にする意味で重要である。

感染症原因菌の検出には原因菌の分離培養を経て、その生化学的性状をもとに菌の同定を行う培養同定法、原因菌特異的遺伝子をもとに PCR 法などにより増幅し検出する遺伝子診断法、原因菌の表面抗原マーカーとの抗体の特異反応を利用して原因菌検出を行う免疫的手法に大別できるが、培養同定法、遺伝子診断法は検出結果を得るまでに時間がかかり、短時間にしかも高感度に原因菌を検出し、迅速かつ適切な患者への治療につながる点で免疫法による診断が汎用されている。

従来免疫法による感染症原因菌の検出には、菌種によって様々なマーカー抗原と抗体の組み合わせが使われている。

例えばクラミジア (Chlamydia) 属の場合、属特異的抗原であるリポ多糖 (LPS) の抗原決定基としての存在が知られており (Stephens, R. ら: J. Immunol., 128: 1083-89, 1982, Caldwell. M. D.: Inf. Immun., 44:306-14, 1984)、様々な診断用キットにおいて特にクラミジア トラコマチス (Chlamydia trachomatis) の検出用試薬抗体に利用されている。

また、Chlamydia 属の外膜主要蛋白質 (MOMP; Major Outer Membrane

いた免疫診断法はいまだに知られていない。

[発明の開示]

本発明は、理想的な微生物の検出・免疫診断法を可能とする統一マーカー抗原としてそれぞれの微生物について同一の分子に対する抗体、特に検出したい全ての微生物について細胞内の同一機能成分分子を用いて微生物の進化の過程で変化が生じてきた部分に対する抗体、該抗体を用いた特異的でかつほぼ全ての血清型をカバーできる微生物検出方法、微生物検出用試薬キット及び微生物検出用特異抗体の作製方法を提供しようとするものである。

本発明者らは、全ての微生物において同一の機能が保存されている蛋白質を有用な抗原蛋白質として見出した。通常、このような蛋白質の構造変化は極めて少ないと予想される。しかし驚くべきことに、該蛋白質の抗原エピトープは微生物の種あるいは属特異的であり、該蛋白質に対する抗体は、微生物の種あるいは属特異的な識別に用いることが可能な多様性を持つと共に、対象となる微生物についてはその全ての血清型を検出するものであることが見出されたのである。

本発明者らは全ての微生物細胞に存在し、しかもそのアミノ酸構造が微生物間である程度の相違点をもつ細胞内分子、特にリボソーム蛋白質の一種であるリボソーム蛋白質 L7/L12(Ribosomal Protein L7/L12)に着目した。Ribosomal Protein L7/L12 は蛋白質合成に必須なリボソーム蛋白質としてその存在が知られている分子量約 13 キロダルトンの蛋白質であり、特に大腸菌、枯草菌などいくつかの微生物でその全アミノ酸配列の解析が進んでおり、微生物間で 50%～65%程度のアミノ酸配列の相同性が確認されている。

本発明者らはこの分子が微生物間で類似しているにもかかわらずその一部に各微生物固有のアミノ酸配列等の構造部分を持つことに着目し、該蛋白質に対する抗体を利用することで様々な微生物に特異的でかつ同一菌種内の全ての血清型について検出が可能であることを見いだした。具体的に

物検出方法、

11) 各種の微生物について同一機能の細胞内分子に対する抗体を用いる微生物検出用試薬キット、

12) 各種の微生物について 1) から 8) のいずれかに記載の抗体を用いる微生物検出用試薬キット、

13) 遺伝子操作手法によりあるいは微生物からの単離精製により得られた微生物の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質、その部分ペプチド、またはその部分ペプチドに相当する合成ペプチドを免疫源とする 1) から 8) のいずれかに記載の抗体の作製方法。

以下本発明について詳細に説明する。

配列表において配列番号 1 及び 2 は Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の DNA 配列及び対応するアミノ酸配列である。配列番号 3 及び 4 はヘリコバクター ピロリ (Helicobacter pylori) の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の DNA 配列及び対応するアミノ酸配列である。配列番号 5 及び 6 は Streptococcus pneumoniae の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の DNA 配列及び対応するアミノ酸配列である。配列番号 7 及び 8 は Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の DNA 配列及び対応するアミノ酸配列である。配列番号 9 及び 10 はナイセリア メニンギチデス (Neisseria meningitidis) の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の DNA 配列及び対応するアミノ酸配列である。配列番号 11 及び 12 は Haemophilus influenzae からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の取得に用いた PCR のプライマー DNA である。配列番号 13 及び 14 は Streptococcus pneumonoiae からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の取得に用いた PCR のプライマー DNA である。配列番号 15 及び 16 は Neisseria gonorrhoeae からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の取得に用いた PCR のプライマー DNA である。配列番号 17 及び 18 は Haemophilus influenzae から取得した Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の DNA 配列及び対応するアミノ酸配列である。配列番号 19 及び 20 は Streptococcus pneumoniae から取得した Ribosomal Protein L7/L12 遺伝

い。

本発明において抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体をさし、該リボソーム蛋白質の全長あるいはその部分ペプチドを用いて作成することができる。抗体を作成するためのペプチドの長さは特に限定されないが Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に対する抗体の場合、この蛋白質を特徴づけられる長さがあれば良く、好ましくは 5 アミノ酸以上、特に好ましくは 8 アミノ酸以上のペプチドを用いれば良い。このペプチドあるいは全長蛋白質をそのまま、または KLH (keyhole-limpet hemocyanin) や BSA (bovine serum albumin) といったキャリア蛋白質と架橋した後必要に応じてアジュバントとともに動物へ接種せしめ、その血清を回収することで Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質を認識する抗体 (ポリクローナル抗体) を含む抗血清を得ることができる。また抗血清より抗体を精製して使用することもできる。接種する動物としてはヒツジ、ウマ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット等であり、特にポリクローナル抗体作製にはヒツジ、ウサギなどが好ましい。また、ハイブリドーマ細胞を作製する公知の方法によりモノクローナル抗体を得ることも可能であるが、この場合はマウスが好ましい。また該蛋白質の全長またはアミノ酸 5 残基以上、望ましくは 8 残基以上の部分ペプチドを GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ) などと融合させたものを精製して、または未精製のまま、抗原として用いることもできる。成書 (Antibodies a laboratory manual, E. Harlow et al., Cold Spring Harbor Laboratory) に示された各種の方法ならびに遺伝子クローニング法などにより分離されたイムノグロブリン遺伝子を用いて、細胞に発現させた遺伝子組み換え抗体によっても作製することができる。

本発明のマーカー抗原として用いることができる Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に対する抗体は、以下の 3 つの方法あるいはその他の類似の方法によって取得することができるが、これらの方法に限定されるものではない。

a) Ribosomal Protein L7/L12 の遺伝子配列およびアミノ酸配列が既知の微生物については、他の微生物における該蛋白質のアミノ酸配列との類似

合 Ribosomal Protein L7/L12 の全長蛋白質が抗原となるため微生物間で保存されているアミノ酸部分に対する抗体を取得しても本発明の目的に合致しない。従って、本法によって取得した抗原に対しては公知の手法によりモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを取得し、該当する微生物とのみ反応する抗体を産生するクローンを選択することにより目的の抗体を取得することができる。

c) あるいは Ribosomal Protein L7/L12 のアミノ酸配列が未知な場合の別な方法として、既知の Ribosomal Protein L7/L12 のアミノ酸配列のうち微生物間で保存されている共通配列部分に相当する 5~30 アミノ酸の合成ペプチドを作製し、そのペプチド配列に対し公知の方法でポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体を作製し、該抗体を用いたアフィニティークラムクロマトによって目的の微生物細胞破碎液を精製することにより高度に精製された Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質を取得することができる。

蛋白質の精製度が不足している場合は公知の精製手法であるイオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過などの手法により精製した後作製した抗体によるウェスタンブロットなどの方法により Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の溶出画分を同定し精製蛋白質を得ることができる。得られた精製 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗原を基にして公知の方法によりハイブリドーマあるいはポリクローナル抗体を取得し b) と同様に目的の微生物に特異的に反応するハイブリドーマあるいはポリクローナル抗体を選択することにより目的の抗体を取得することができる。

前記 a)~c) などの方法によって取得した本発明における各種微生物特異的な抗体は例えばポリスチレンラテックス粒子上に該抗体を吸着させた凝集反応、マイクロタイタープレート中で行う公知技術である ELISA 法、既存のイムノクロマト法、着色粒子もしくは発色能を有する粒子、または酵素もしくは蛍光体でラベルされた該抗体とともに捕捉 (capture) 抗体で被覆した磁気微粒子などを用いるサンドイッチアッセイなど既知の全ての免疫測定手法に利用することにより種々の目的の微生物に特異的な検出用試薬

ついて 5~30 アミノ酸の合成ペプチドを合成しそのペプチドに対する Haemophilus influenzae 特異的なポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体を作製することができる。

特にポリクローナル抗体の場合、免疫した動物の抗血清を Protein A カラム等で精製し IgG 画分を取得した後、さらに動物の免疫に用いた合成ペプチドによるアフィニティー精製を実施することが望ましい。

さらに Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の DNA 配列から N 末端、C 末端の配列を元にした PCR プライマー、例えば配列表配列番号：11 及び 12 に示す PCR プライマーを設計し、その相同性を利用して、公知の方法に従い、Haemophilus influenzae の培養菌体より抽出したゲノム DNA を材料として PCR 法などにより増幅してくる DNA 断片を取得し、その断片の DNA シーケンス情報を解析することにより Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の全長遺伝子を取得することができる。

取得した Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子は、例えば GST などとフュージョン蛋白質遺伝子を構成し、適当な発現用プラスミドを用いて発現ベクターを構築後、大腸菌等を形質転換して該蛋白質を大量発現させる。形質転換した大腸菌を適当量培養し、回収した菌体破碎液を GST を用いたアフィニティカラムで精製することにより、Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質と GST とのフュージョン蛋白質が得られる。この蛋白質をそのまま、あるいは GST 部分をプロテアーゼなどにより切断後、抗原蛋白質として公知の手法により、複数のハイブリドーマを確立し、Haemophilus influenzae 菌体あるいは菌体破碎液または Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に特異的な反応を示す抗体を選択することにより目的の特異的モノクローナル抗体を取得することも可能である。

また Haemophilus influenzae と同様に呼吸器感染症原因菌として診断意義の高い Streptococcus pneumoniae についても Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質のアミノ酸配列及び DNA 配列はデータベース等の記載により

Neisseria meningitidis の Ribosomal Protein L7/L12 の蛋白質遺伝子に該当する遺伝子配列がインターネット上で公開されており容易に入手可能である。この Neisseria meningitidis の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の全塩基配列および対応するアミノ酸配列を配列表配列番号：9 及び 10 に示す。ここで Neisseria gonorrhoeae と Neisseria meningitidis の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の全塩基配列を比較するとアミノ酸配列の異なる部分は N 末端から 115 番目のアミノ酸が Neisseria gonorrhoeae はアラニンであるのに対して Neisseria meningitidis の場合はグルタミン酸であるただ 1 個のアミノ酸の違いだけである。従って、Neisseria gonorrhoeae を種特異的に検出することができる Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗体は該当する Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の N 末端から 115 番目のアラニン及びそれを含むアミノ酸領域をエピトープとして認識する抗体であると断定できる。

本発明に基づき作製された抗体は、公知の測定手法であるポリスチレンラテックス粒子上に該抗体を吸着させた凝集反応、マイクロタイタープレート中で行う公知技術である ELISA 法、既存のイムノクロマト法、着色粒子もしくは発色能を有する粒子、または酵素もしくは蛍光体でラベルされた該抗体とともに capture 抗体で被覆した磁気微粒子などを用いるサンドイッチアッセイなど既知の全ての免疫測定手法に利用できる。

また本発明に基づき作製された抗体は全ての免疫測定手法において当該抗原蛋白質を固相あるいは液相中で捕獲する capture 抗体として機能すると同時にパーオキシダーゼやアルカリフォスファターゼなどの酵素を公知の方法により修飾することによりいわゆる酵素標識抗体としても機能する。

[発明を実施するための最良の形態]

以下の例は本発明を具体的に説明するためのものであって本発明について何らその範囲を限定するものではない。

た。 酵素に添付のバッファーを $5\mu\text{l}$ 、酵素に添付の dNTP mixture $4\mu\text{l}$ と配列表配列表番号：11 に示した合成オリゴヌクレオチド A 及び配列表配列表番号：12 に示したオリゴヌクレオチド B をそれぞれ 200pmol 加え、最終容量 $50\mu\text{l}$ とした。

この混合物を、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480 を用いて、 95°C 1 分、 50°C 2 分、 72°C 3 分を 5 サイクル行った後、 95°C 1 分、 60°C 2 分、 72°C 3 分を 25 サイクル行った。この PCR 産物の一部を 1.5% アガロースゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド（日本ジーン社製）にて染色後、紫外線下で観察し、約 400bp の cDNA が増幅されていることを確認した。さらに制限酵素 BamHI および XhoI で切断処理後、1.5% アガロースゲル中で電気泳動を行いエチジウムブロマイド染色後約 370bp のバンドをゲルから切り出して Suprec01（宝酒造社製）で精製後、市販のベクターである pGEX-4T-1（Pharmacia 社製）に組み込んだ。同ベクターは目的の遺伝子断片を適当な制限酵素サイトに組み込むことにより GST 蛋白質とのフュージョン蛋白質を発現しうる目的分子の発現ベクターとして機能することができる。

具体的には、ベクター pGEX-4T-1 と先の DNA とをそのモル比が 1:3 となるように混ぜ合わせて、T4 DNA リガーゼ（Invitrogen 社製）にてベクターに DNA を組み込んだ。DNA が組み込まれたベクター pGEX-4T-1 を大腸菌 One Shot Competent Cells（Invitrogen 社製）に遺伝子導入し、アンピシリン（Sigma 社製）を $50\mu\text{g/ml}$ 含む L-Broth（宝酒造社製）半固型培地のプレートに蒔き、12 時間程度 37°C に放置し、現れてきたコロニーを無作為選択し、同濃度のアンピシリンを含む L-Broth 液体培地 2ml に植え付け、8 時間程度 37°C で振盪培養し、菌体を回収し、ウィザードミニプレップ

（Promega 社製）を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離し、このプラスミドを制限酵素 BamHI/XhoI にて消化して、約 370bp の DNA が切り出されてくることで該 PCR 産物が組み込まれていることを確認し、確認されたクローンについて、組み込まれている DNA の塩基配列決定を行った。

挿入 DNA 断片の塩基配列の決定は、Applied Biosystems 社製の蛍光シー

β -D(-)-チオガラクトピラノシド (IPTG) 550 μ l 入れ 4 時間培養後回収し、250ml ずつ遠心チューブにいて 7000rpm、10 分間遠心した。上澄みを棄てて 50mM トリス塩酸 (Tris-HCl) pH7.4、25% スクロース (Sucrose) を含む Lysis バッファー 25ml ずつに溶解した。

さらに、10% ノニデット P-40 (NP-40) 1.25ml、1M $MgCl_2$ 125 μ l を加えてプラスチックチューブに移した。1 分間 \times 5 回氷冷中で sonication を実施し、12000rpm、15 分間遠心後上澄みを回収した。

次に、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) でコンディショニングしたグルタチオンアガロースカラムに前記の上澄み液を吸着させた。

次に、20mM Tris バッファー pH7.4、4.2mM $MgCl_2$ 、1mM ジチオスレイトール (DTT) を含む洗浄液でカラムを 2 ベッドボリューム分洗浄した。その後 5mM のグルタチオンを含む 50mM Tris バッファー pH9.6 で溶出し、分画したフラクション中の蛋白質含有量を色素結合法 (ブラッドフォード法; Biorad 社) で検出し、メインフラクションを取得した。得られた精製 GST フュージョン Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の純度は電気泳動法により確認したところ約 75% であり免疫源として十分な純度を確保できた。

[実施例 3]

Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 の蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製

まずマウスの免疫については Haemophilus influenzae の GST フュージョン Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗原 100 μ g を 200 μ l の PBS に溶解後フロイントのコンプリートアジュバントを 200 μ l 加え混合、エマルジョン化した後 200 μ l を腹腔内に注射した。

さらに、2 週間後、4 週間後、6 週間後に同様のエマルジョン抗原を腹腔内に注射し、さらに 10 週間後、14 週間後に 2 倍濃度の抗原エマルジョン液を腹腔内注射し最終免疫から 3 日後に脾臓を取り出し、細胞融合に供した。

無菌的に取り出したマウスの脾細胞 10^8 個に対し骨髓腫細胞 2×10^7 個を

応し GST 蛋白質には反応しない陽性ウェルが見いだされ Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に対する抗体が含まれていることが判明した。

そこで陽性ウェル中の細胞をそれぞれ回収し 24 穴プラスチックプレート中、HAT 培地で培養した。培養した融合培地を細胞数が約 20 個/ml になるように HT 培地で希釈し 50 μ l を、HT 培地に懸濁した 6 週齢のマウス胸腺細胞 10^6 個と 96 穴培養プレート中で混合後、7%CO₂ 条件下、37°C で 2 週間培養した。培養上澄み中の抗体活性を前述の ELISA 法にて同様に検定し、Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質との反応陽性の細胞を回収した。

さらに、同様の希釈検定、クローニング操作を繰り返し、ハイブリドーマ HIRB-1~5 の計 5 クローンを取得した。

[実施例 4]

Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質と反応するモノクローナル抗体の Neisseria gonorrhoeae および他の微生物との反応試験

前述のようにして取得した陽性ハイブリドーマ細胞を用いて定法に従ってモノクローナル抗体を生産回収した。

具体的には RPMI1640 培地 (10%FCS 入り) を用いて継代培養した細胞をあらかじめ 2 週間前に 0.5ml のプリスタン腹腔内に注射した Balb/C マウスの腹腔内に 5×10^6 個 (PBS 中) 注射し、3 週間後腹水を回収し、その遠心上澄みを取得した。

取得した抗体含有液を Protein A カラム (5ml ベッド, Pharmacia 社) に吸着させ、PBS で 3 ベッドボリューム洗浄し、pH3 のクエン酸バッファーで溶出し、抗体フラクションを回収して各ハイブリドーマの生産するモノクローナル抗体を得た。

この 5 株のハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体を用いて ELISA 法により評価した。

抗体の評価にはサンドイッチアッセイ法を用い、作製したモノクローナル抗体はパーオキシダーゼと化学的に結合させることにより酵素標識抗体

<u>Haemophilus</u> <u>influezae</u>	ATCC9007	+
<u>Haemophilus</u> <u>influezae</u>	ATCC9332	+
<u>Haemophilus</u> <u>influezae</u>	ATCC8142	+
<u>Haemophilus</u> <u>influezae</u>	ATCC9833	+

10⁸ 個/ml 検出結果

<u>Neisseria</u> <u>meningitides</u>	ATCC13090	—
<u>Neisseria</u> <u>lactamica</u>	ATCC30011	—
<u>Neisseria</u> <u>mucosa</u>	ATCC35611	—
<u>Neisseria</u> <u>sicca</u>	ATCC9913	—
<u>Branhamella</u> <u>catarrharis</u>	ATCC25240	—
<u>Neisseria</u> <u>gonorrhoeae</u>	ATCC9793	—
<u>Escherichia</u> <u>coli</u>	ATCC25922	—
<u>Klebsiella</u> <u>pneumoniae</u>	ATCC13883	—

(+ ; ポジティブ、— ; ネガティブ)

[実施例 5]

Streptococcus pneumoniae からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子のクローニング、同蛋白質の大腸菌での大量発現と精製および同蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製。

Streptococcus pneumoniae IID555 株（東京大学医科学研究所より分譲、購入）を血液寒天培地上に適当量植菌した後、インキュベーター中、37℃で 48 時間培養する。生育したコロニーを最終的に 5×10⁹CFU/ml 前後になるように TE Buffer に懸濁する。内約 1.5ml を微量遠心チューブに移し取り 10000rpm で 2 分間遠心し、上澄みを棄てる。沈殿部分を 567μl の TE Buffer に再懸濁する。さらに 30μl の 10%SDS と 3μl の 20mg/ml

6P-1 (Pharmacia 社製) に組み込んだ。同ベクターは目的の遺伝子断片を適当な制限酵素サイトに組み込むことにより GST 蛋白質とのフュージョン蛋白質を発現しうる目的分子の発現ベクターとして機能することができる。具体的にはベクター pGEX-6P-1 と先の DNA とをそのモル比が 1:5 となるように混ぜ合わせて、T4 DNA リガーゼ (Invitrogen 社製) にてベクターに DNA を組み込んだ。DNA が組み込まれたベクター pGEX-6P-1 を大腸菌 One Shot Competent Cells (Invitrogen 社製) に遺伝子導入し、アンピシリン (Sigma 社製) を $50 \mu\text{g/ml}$ 含む L-Broth (宝酒造社製) 半固型培地のプレートに蒔き、12 時間程度 37°C に放置し、現れてきたコロニーを無作為選択し、同濃度のアンピシリンを含む L-Broth 液体培地 2ml に植え付け、8 時間程度 37°C で振とう培養し、菌体を回収し、ウィザードミニプレップ (Promega 社製) を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離し、このプラスミドを制限酵素 BamHI/XhoI にて消化して、約 370bp の DNA が切り出されてくることで該 PCR 産物が組み込まれていることを確認し、確認されたクローンについて、組み込まれている DNA の塩基配列決定を行った。

挿入 DNA 断片の塩基配列の決定は、Applied Biosystems 社製の蛍光シーケンサーを用いて実施した。シーケンスサンプルの調製は PRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社製) を用いて行った。 0.5ml 容のマイクロチューブに $9.5 \mu\text{l}$ の反応ストック液、 $4.0 \mu\text{l}$ の $0.8\text{pmol}/\mu\text{l}$ の T7 プロモータープライマー (GIBCO BRL 社製) 及び $6.5 \mu\text{l}$ の $0.16 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ のシーケンス用鋳型 DNA を加えて混合し、 $100 \mu\text{l}$ のミネラルオイルを重層後、 96°C 30 秒、 55°C 15 秒および 60°C 4 分を 1 サイクルとする PCR 増幅反応を 25 サイクル行い、 4°C で 5 分間保温した。反応後、 $80 \mu\text{l}$ の滅菌精製水を加えて攪拌し、遠心分離後、その水層を 3 回のフェノール・クロロホルム抽出を行った。 $100 \mu\text{l}$ の水層に $10 \mu\text{l}$ の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) および $300 \mu\text{l}$ のエタノールを加えて攪拌後、室温、14,000rpm にて 15 分間の遠心を行い沈殿を回収した。沈殿を 75%エタノールで洗浄後、真空下に 2 分間静置して乾燥させ、シーケンス用サンプルとした。シーケンスサンプルは、 $4 \mu\text{l}$ の 10mM

り GST 部分を Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質部分から切り離した。

次に PBS でコンディショニングしたグルタチオンセファロースカラムに反応液を通し、通過液を回収し、さらに PBS を 1 ベッドボリューム流し、これも回収した。取得した精製 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の純度は電気泳動法により確認したところ約 90%であり免疫源として十分な純度を確保できた。

まずマウスの免疫については Streptococcus pneumoniae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗原 100 μ g を 200 μ l の PBS に溶解後フロイントのコンプリータジュバントを 200 μ l 加え混合、エマルジョン化した後 200 μ l を腹腔内に注射した。さらに 2 週間後、4 週間後、6 週間後に同様のエマルジョン抗原を腹腔内に注射し、さらに 10 週間後、14 週間後に 2 倍濃度の抗原エマルジョン液を腹腔内注射し最終免疫から 3 日後に脾臓を取り出し、細胞融合に供した。

無菌的に取り出したマウスの脾細胞 10^8 個に対し骨髓腫細胞 2×10^7 個をガラスチューブに取り良く混合した後 1500rpm で 5 分間遠心し上澄みを棄て、その後細胞をよく混合した。

細胞融合に使用した骨髓腫細胞は NS-1 系の細胞株を用い 10%FCS を含む RPMI1640 培地で培養し、細胞融合の 2 週間前から 0.13mM のアザグアニン、0.5 μ g/ml の MC-210、10%FCS を含む RPMI1640 培地で 1 週間培養後、さらに 10%FCS を含む RPMI1640 培地で 1 週間培養したものを用いた。混合した細胞サンプルに 37℃に保温した 50ml の RPMI1640 培地を 30ml 加え 1500rpm で遠心、上澄み除去後 37℃に保温した 50%ポリエチレングリコールを 1ml 加え激しく攪拌しながら 2 分間処理後、37℃に保温した 10ml の RPMI1640 培地を加え液を滅菌ピペットで吸引、排出しながら約 5 分間激しく攪拌混合した。

1000rpm で 5 分間遠心、上澄み除去後さらに 30ml の HAT 培地を加え細胞濃度が 5×10^6 個/ml になるように調整し攪拌均一化後、96 穴プレート型培養プレートに 0.1ml ずつ分注し 7%CO₂ 条件下、37℃で培養し、1 日目、1 週間目、2 週間目に HAT 培地を 0.1ml ずつ加えた。

がってモノクローナル抗体を生産回収した。

具体的には RPMI1640 培地 (10%FCS 入り) を用いて継代培養した細胞を 25cm² 培養フラスコ中で 2×10^5 個/ml、 3.3×10^5 個及び 5×10^5 個/ml 程度に無血清培地にて希釈し全容を 5ml とした。7%CO₂、37℃で 3～5 日間増殖させ、細胞の増殖がみられたフラスコの内、元の細胞数が最も少ないものを選択し、最終的に 2×10^5 個/ml 希釈のものが 3～4 日間で 2×10^6 個/ml に増殖するようになるまで同様の操作を繰り返し無血清培地に馴化させた。次に細菌培養用 96 穴プレート中でクローニングを行い、増殖が早く抗体価の高い細胞を選択した。選択した細胞を 24 穴プレートで増殖させたものを 25cm² 培養フラスコ中で 2×10^5 個/ml 程度となるように無血清培地で希釈し全容 10ml とした。これを 7%CO₂、37℃で 3～4 日間培養し 1×10^6 個/ml まで増殖させた後、75cm² 培養フラスコにて同様に増殖させ 1×10^6 個/ml、100ml を大量培養用ボトルに移した。これに無血清培地 100ml を加え、攪拌しながら 37℃で 2 日培養後、無血清培地 200ml 加えさらに 2 日培養した。この培養液を 4 本に分け各々 100ml の無血清培地を添加し、2 日培養し各々 400ml の無血清培地を添加後さらに約 6 日培養した後、培養液を回収し 10000rpm15 分の遠心により目的とする抗体を含む培養上清を取得した。培養上清は 0.1%アジ化ソーダ添加後 4℃で保存した。取得した抗体含有液 100ml を PBS で 5 倍に希釈後 ProteinG カラム (5ml ベッド, Pharmacia 社) に吸着させ、PBS で 3 ベッドボリューム洗浄し、pH3 のクエン酸バッファーで溶出し、抗体フラクションを回収して各ハイブリドーマの生産するモノクローナル抗体を得た。この 4 株のハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体は特表平 7-509565 号公報に記載されている OIA 法により評価した。

すなわち OIA 法は窒化珪素の薄膜層をもつシリコンウエハー上に capture 用抗体を反応させた反応用基材を作製し、これに抗原物質すなわち微生物の抽出液を一定時間反応させた後、捕捉された抗原と酵素標識した抗体 (増幅試薬) とをさらに反応させ、最後に基質溶液を加えて生じた薄膜沈殿による光干渉色の濃さにより、抗原抗体反応を視覚的に判定できる方法である。

10⁶ 個/ml 検出結果

<u>Streptococcus pneumoniae</u>	ATCC27336	+
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	IID554	+
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	IID555	+
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	IID556	+
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	IID557	+
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	IID558	+
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	IID559	+
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	IID1603	+

10⁸ 個/ml 検出結果

<u>Escherichia coli</u>	ATCC25922	—
<u>Enterococcus faecalis</u>	ATCC19433	—
<u>Haemophilus influenzae</u>	ATCC10211	—
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	ATCC13883	—
<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	IID821	—
<u>Neisseria lactamica</u>	ATCC23970	—
<u>Neisseria meningitidis</u>	ATCC13090	—
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	ATCC27853	—
<u>GroupB streptococcus</u>	ATCC12386	—
<u>Staphylococcus aureus</u>	ATCC25923	—
<u>Streptococcus pyogenes</u>	ATCC19615	—

(+ ; ポジティブ、— ; ネガティブ)

[実施例 7]

Neisseria gonorrhoeae からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子のクローニング、同蛋白質の大腸菌での大量発現、精製および同蛋白質の対するモノクローナル抗体の作製。

とに設計した配列表配列番号：15に示した合成ヌクレオチドE及び配列表配列番号：16に示したオリゴヌクレオチドFをプローブとしてそれぞれ200 pmolを加え、最終容量50 μ lとした。

この混合物を、TaKaRa PCR Thermal Cycler 480を用いて、95℃ 1分、50℃ 2分、72℃ 3分を5サイクル行った後、95℃ 1分、60℃ 2分、72℃ 3分を25サイクル行った。このPCR産物の一部を1.5%アガロースゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド（日本ジーン社製）にて染色後、紫外線下で観察し、約400bpのcDNAが増幅されていることを確認した。さらに制限酵素 BamHI および XhoI で切断処理後、1.5%アガロースゲル中で電気泳動を行いエチジウムブロマイド染色後約370bpのバンドをゲルから切り出して Suprec01(宝酒造社製)で精製後、市販のベクターである pGEX-4T-1 (Pharmacia 製)に組み込んだ。具体的にはベクター pGEX-4T-1 と先の DNA とをそのモル比が 1:3 となるように混ぜ合わせて、T4 DNA リガーゼ (Invitrogen 社製) にてベクターに DNA を組み込んだ。DNA が組み込まれたベクター pGEX-4T-1 を大腸菌 One Shot Competent Cells

(Invitrogen 社製) に遺伝子導入し、アンピシリン (Sigma 社製) を 50 μ g/ml 含む L-Broth (宝酒造社製) 半固型培地のプレートに蒔き、12時間程度 37℃に放置し、現れてきたコロニーを無作為選択し、同濃度のアンピシリンを含む L-Broth 液体培地 2ml に植え付け、8時間程度 37℃で振盪培養し、菌体を回収し、ウィザードミニプレップ (Promega 社製) を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離し、このプラスミドを制限酵素 BamHI/XhoI にて消化して、約 370bp の DNA が切り出されてくることで該 PCR 産物が組み込まれていることを確認し、確認されたクローンについて、組み込まれている DNA の塩基配列決定を行った。

挿入 DNA 断片の塩基配列の決定は、Applied Biosystems 社製の蛍光シーケンサーを用いて実施した。シーケンスサンプルの調製は PRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社製) を用いて行った。0.5ml 容のマイクロチューブに 9.5 μ l の反応ストック液、4.0 μ l の 0.8pmol/ μ l の T7 プロモータープライマー

前述のようにして取得した陽性ハイブリドーマ細胞 GCRB-3 を用いて定法にしたがってモノクローナル抗体を生産回収した。

具体的には、RPMI1640 培地 (10% FCS 入り) を用いて継代培養した細胞をあらかじめ 2 週間前に 0.5ml のプリスタン腹腔内に注射した Balb/C マウスの腹腔内に 5×10^6 個 (PBS 中) 注射し、3 週間後腹水を回収し、その遠心上澄みを取得した。取得した抗体含有液を ProteinA カラム (5ml ベッド, Pharmacia 社製) に吸着させ、PBS で 3 ベッドボリューム洗浄し、pH のクエン酸バッファーで溶出し、抗体フラクションを回収してハイブリドーマの生産するモノクローナル抗体を得た。この GCRB-3 ハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体を用いて ELISA 法により評価した。

抗体の評価にはサンドイッチアッセイ法を用い、作製したモノクローナル抗体はパーオキシダーゼと化学的に結合させることにより酵素標識抗体として使用した。すなわち酵素標識はホースラディッシュパーオキシダーゼ (Sigma グレード V I) を用い結合には試薬 S-アセチルチオ酢酸 N-ヒドロキシスクシンイミドを使用し Analytical Bio-chemistry 132 (1983), 68-73 に述べられている方法に従って行った。ELISA 反応においては 0.05% のアジ化ソーダを含む PBS 中に溶解した市販の抗淋菌ポリクローナル抗体 (ヴァイロスタット社、ウサギ) を $10 \mu\text{g/ml}$ 濃度で希釈した液を $100 \mu\text{l}$ ずつ 96 穴プレートの別々に分注し 4°C で 1 晩吸着させた。

上澄み除去後、1% 牛血清アルブミン溶液 (PBS 中) $200 \mu\text{l}$ 添加し室温で 1 時間反応しブロッキングした。上澄み除去後洗浄液 (Tween20 0.02%、PBS) で洗浄し、その上に各種微生物の培養液に 0.3% 濃度の Triton X-100 により室温で 5 分間抽出操作をほどこした抗原液を $100 \mu\text{l}$ を加え室温で 2 時間反応後上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄後、 $5 \mu\text{g/ml}$ のペルオキシダーゼ標識抗 Ribosomal Protein L7/L12 抗体液を $100 \mu\text{l}$ 加え室温、1 時間反応を実施し、上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄した後 TMB 溶液 (KPL 社) を $100 \mu\text{l}$ ずつ加え室温で 20 分反応、発色後 1N の硫酸を $100 \mu\text{l}$ 添加して反応を停止し、450nm の吸光を測定した。

その結果、表 3 に示すように酵素標識抗体としてハイブリドーマ GCRB-3

<u>Neisseria mucosa</u>	ATCC35611	—
<u>Neisseria sicca</u>	ATCC9913	—
<u>Branhamella catarrharis</u>	ATCC25240	—
<u>Haemophilus influenzae</u>	ATCC10211	—
<u>Escherichia coli</u>	ATCC25922	—
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	ATCC13883	—

(+ ; ポジティブ、- ; ネガティブ)

[実施例 9]

Neisseria 属特異的抗 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質モノクローナル抗体の取得

Neisseria gonorrhoeae IID821 株（東京大学医科学研究所より分譲、購入）をチョコレート寒天培地上に適量植菌した後、CO₂ インキュベーター中、CO₂ 濃度 0.5%条件で 37℃で 24 時間培養する。生育したコロニーを最終的に 5×10^9 CFU/ml 前後になるように TE Buffer に懸濁する。そのうち約 1.5ml を微量遠心チューブに移し取り 10000rpm で 2 分間遠心し、上澄みを棄てる。沈殿部分を 567 μ l の TE Buffer に再懸濁する。さらに 30 μ l の 10%SDS と 3 μ l の 20mg/ml Proteinase K 溶液を加えて良く混合し、37℃で 1 時間インキュベートする。次に 10%のセチルトリメチルアンモニウムブロマイド/0.7M NaCl 溶液を 80 μ l 追添し、よく混合した後 65℃で 10 分間インキュベートする。次に、体積比 24/1 のクロロホルム-イソアミルアルコール混合液を 700 μ l 加えよく攪拌する。この溶液を微量遠心機で 12000rpm、5 分間(4℃コントロール下)遠心処理した後、水層画分を新しい微量遠心管に移す。そこに 0.6 倍量のイソプロパノールを加えチューブをよく振って DNA の沈殿を形成する。白い DNA 沈殿をガラス棒ですくって 1ml の 70%エタノール (-20℃に冷却したもの) が入った別の微量遠心管に移す。

DNA を組み込んだ。DNA が組み込まれたベクター pGEX-6P-1 を大腸菌 One Shot Competent Cells (Invitrogen 社製) に遺伝子導入し、アンピシリン (Sigma 社製) を $50 \mu\text{g/ml}$ 含む L-Broth (宝酒造社製) 半固型培地のプレートに蒔き、12 時間程度 37°C に放置し、現れてきたコロニーを無作為選択し、同濃度のアンピシリンを含む L-Broth 液体培地 2ml に植え付け、8 時間程度 37°C で振とう培養し、菌体を回収し、ウィザードミニプレップ (Promega 社製) を用いて添付の説明書に従ってプラスミドを分離し、このプラスミドを制限酵素 BamHI/XhoI にて消化して、約 370bp の DNA が切り出されてくることで該 PCR 産物が組み込まれていることを確認し、確認されたクローンについて、組み込まれている DNA の塩基配列決定を行った。

挿入 DNA 断片の塩基配列の決定は、Applied Biosystems 社製の蛍光シーケンサーを用いて実施した。シーケンスサンプルの調製は PRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社製) を用いて行った。0.5ml 容のマイクロチューブに $9.5 \mu\text{l}$ の反応ストック液、 $4.0 \mu\text{l}$ の $0.8\text{pmol}/\mu\text{l}$ の T7 プロモータープライマー (GIBCO BRL 社製) 及び $6.5 \mu\text{l}$ の $0.16 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ のシーケンス用鋳型 DNA を加えて混合し、 $100 \mu\text{l}$ のミネラルオイルを重層後、 96°C 30 秒、 55°C 15 秒及び 60°C 4 分を 1 サイクルとする PCR 増幅反応を 25 サイクル行い、 4°C で 5 分間保温した。反応後、 $80 \mu\text{l}$ の滅菌精製水を加えて攪拌し、遠心分離後、その水層を 3 回のフェノール・クロロホルム抽出を行った。 $100 \mu\text{l}$ の水層に $10 \mu\text{l}$ の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) および $300 \mu\text{l}$ のエタノールを加えて攪拌後、室温、14000rpm にて 15 分間の遠心を行い沈殿を回収した。沈殿を 75%エタノールで洗浄後、真空下に 2 分間静置して乾燥させ、シーケンス用サンプルとした。シーケンスサンプルは、 $4 \mu\text{l}$ の 10mM の EDTA を含むホルムアミドに溶解して 90°C 、2 分間で変性後、氷中で冷却してシーケンスに供した。

得られた 4 個のクローンの内 1 個の配列に PCR に用いたプローブと配列の相同性がありさらに他の微生物、例えば Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子配列と非常に類似した DNA 配列が見い

きた。

まずマウスの免疫については Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗原 $100\mu\text{g}$ を $200\mu\text{l}$ の PBS に溶解後フロイントのコンプリートアジュバントを $200\mu\text{l}$ 加え混合、エマルジョン化した後 $200\mu\text{l}$ を腹腔内に注射した。さらに 2 週間後、4 週間後、6 週間後に同様のエマルジョン抗原を腹腔内に注射し、さらに 10 週間後、14 週間後に 2 倍濃度の抗原エマルジョン液を腹腔内注射し最終免疫から 3 日後に脾臓を取り出し、細胞融合に供した。

無菌的に取り出したマウスの脾細胞 10^8 個に対し骨髓腫細胞 2×10^7 個をガラスチューブに取り良く混合した後 1500rpm で 5 分間遠心し上澄みを棄て、その後細胞をよく混合した。

細胞融合に使用した骨髓腫細胞は NS-1 系の細胞株を用い 10%FCS を含む RPMI1640 培地で培養し、細胞融合の 2 週間前から 0.13mM のアザグアニン、 $0.5\mu\text{g/ml}$ の MC-210、10%FCS を含む RPMI1640 培地で 1 週間培養後、さらに 10%FCS を含む RPMI1640 培地で 1 週間培養したものを用いた。混合した細胞サンプルに 37°C に保温した 50ml の RPMI1640 培地を 30ml 加え 1500rpm で遠心、上澄み除去後 37°C に保温した 50%ポリエチレングリコールを 1ml 加え激しく攪拌しながら 2 分間処理後、 37°C に保温した 10ml の RPMI1640 培地を加え液を滅菌ピペットで吸引、排出しながら約 5 分間激しく攪拌混合した。

1000rpm で 5 分間遠心、上澄み除去後さらに 30ml の HAT 培地を加え細胞濃度が 5×10^6 個/ ml になるように調整し攪拌均一化後、96 穴プレート型培養プレートに 0.1ml ずつ分注し 7% CO_2 条件下、 37°C で培養し、1 日目、1 週間目、2 週間目に HAT 培地を 0.1ml ずつ加えた。

次に目的の抗体を生産している細胞をスクリーニングするために ELISA 法による評価を実施した。 0.05% のアジ化ソーダ含む PBS 中に溶解した Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質を $10\mu\text{g/ml}$ 濃度で希釈した液を $100\mu\text{l}$ ずつ 96 穴プレートの別々に分注し 4°C で 1 晩吸着させた。上澄み除去後、1%牛血清アルブミン溶液 (PBS 中) $200\mu\text{l}$ 添加し

全容 10ml とした。これを 7%CO₂、37℃で 3～4 日間培養し 1×10⁶ 個/ml まで増殖させた後、75cm² 培養フラスコにて同様に増殖させ 1×10⁶ 個/ml、100ml を大量培養用ボトルに移した。これに無血清培地 100ml を加え、攪拌しながら 37℃で 2 日培養後、無血清培地 200ml 加えさらに 2 日培養した。この培養液を 4 本に分け各々 100ml の無血清培地を添加し、2 日培養し各々 400ml の無血清培地を添加後さらに約 6 日培養した後、培養液を回収し 10000rpm15 分の遠心により目的とする抗体を含む培養上清を取得した。培養上清は 0.1%アジ化ソーダ添加後 4℃で保存した。取得した抗体含有液 100ml を PBS で 5 倍に希釈後 ProteinG カラム (5ml ベッド、Pharmacia 社) に吸着させ、PBS で 3 ベッドボリューム洗浄し、pH3 のクエン酸バッファーで溶出し、抗体フラクションを回収して各ハイブリドーマの生産するモノクローナル抗体を得た。

この 4 株のハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体は特表平 7-509565 号公報に記載されている OIA 法により評価した。

すなわち OIA 法は窒化珪素の薄膜層をもつシリコンウエハー上に capture 用抗体を反応させた反応用基材を作製し、これに抗原物質すなわち微生物の抽出液を一定時間反応させた後、捕捉された抗原と酵素標識した抗体 (増幅試薬) とをさらに反応させ、最後に基質溶液を加えて生じた薄膜沈殿による光干渉色の濃さにより、抗原抗体反応を視覚的に判定できる方法である。

作製したモノクローナル抗体は OIA 法の窒化珪素の薄膜層をもつシリコンウエハー上に固相化する capture 抗体として使用した。また detect 抗体としては参考例に記載した種々の微生物の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質と非特異的に反応しうる AMGC-1 モノクローナル抗体をパーオキシダーゼで酵素標識したものを使用した。すなわち酵素標識はホースラディッシュパーオキシダーゼ (Sigma グレード VI) を用い結合には試薬 S-アセチルチオ酢酸 N-ヒドロキシスクシンイミドを使用し Analytical Biochemistry 132(1983), 68-73 に述べられている方法に従って行った。

OIA 反応においては 0.05%アジ化ナトリウムを含む PBS 中のモノクローナ

<u>GroupB streptococcus</u>	ATCC12386	—
<u>Staphylococcus aureus</u>	ATCC25923	—
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	ATCC27336	—
<u>Streptococcus pyogenes</u>	ATCC19615	—

(+ ; ポジティブ、— ; ネガティブ)

[実施例 10]

Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質固定化アフィニティカラムを用いた Haemophilus influenzae Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質と特異的に反応するポリクローナル抗体の取得。

0.5%濃度の Triton X-100 で処理した Haemophilus influenzae 菌体抽出液の遠心上清を抗原として使用した。抗原 100 μ g を含む生理食塩水溶液約 1.2ml にフロイントのアジュバンド 1.5ml を加えエマルジョン化した後、4匹の SPF Japanese White Rabbit に皮下注射し免疫した。2週間おきに 5～6回免疫し、抗体価を確認した。

抗体価の確認は ELISA 法により実施した。0.05%のアジ化ソーダ含む PBS 中に溶解した Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質を 10 μ g/ml 濃度に希釈した液を 100 μ l ずつ 96 穴プレートに分注し 4℃で 1 晩吸着させた。上澄み除去後、1%牛血清アルブミン溶液(PBS 中)200 μ l 添加し室温で 1 時間反応しブロッキングする。上澄み除去後洗浄液 (0.02% Tween20、PBS) で洗浄し、その上に正常ウサギ血清と免疫後のウサギ抗血清を段階希釈したもの 100 μ l を加え室温で 2 時間反応後、上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄後、50ng/ml のペルオキシダーゼ標識抗ラビット IgG 抗体液を 100 μ l 加え室温、1 時間反応を実施し、上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄した後 OPD 溶液(Sigma 社)を 100 μ l ずつ加え室温で 20 分反応、発色後 1N の硫酸を 100 μ l 添加して反応を停止し、492nm の吸光を測定した。

抗体価上昇を確認できたものにつき、大量採血を実施した。耳動脈から血液をガラス製遠心管に採取し、37℃ 1 時間放置後、4℃ 一晩静置した。

で酵素標識したものを使用した。酵素標識はホースラディッシュペーパーオキシダーゼ (Sigma グレード VI) を用い結合には試薬 S-アセチルチオ酢酸 N-ヒドロキシスクシンイミドを使用し Analytical Bio-chemistry 132 (1983), 68-73 に述べられている方法に従って行った。

OIA 反応においては 0.05% アジ化ナトリウムを含む PBS 中の精製ポリクローナル抗体を 10 μ g/ml 濃度に 0.1M HEPES pH8.0 で希釈した液を 50 μ l ずつシリコンウエハー上に添加し室温で 30 分反応させた後、蒸留水で洗浄した後、使用した。

その上に各種微生物の懸濁液に 0.5% 濃度の Triton X-100 により室温で 5 分間抽出操作をほどこした抗原液を 15 μ l を加え室温で 10 分間反応後、20 μ g/ml のペルオキシダーゼ標識 AMGC1 を 15 μ l 加え室温 10 分間反応を実施し、蒸留水で洗浄した後、基質溶液 (KPL 社) を 15 μ l ずつ加え、室温で 5 分反応し、蒸留水で洗浄後青色の濃さを目視で判定した。

その結果表 5 に示すように capture 抗体として APhi2-2 の精製ポリクローナル抗体を用いた場合、10⁸ 個/ml の菌濃度で試験した Haemophilus influenzae を検出すると同時に他の微生物について反応性を示さず、Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質固定化アフィニティカラムで精製したポリクローナル抗体を用いることで Haemophilus influenzae 特異的な反応性をもつ抗体を取得したことが明確に確認できた。

[表 5]

10 ⁸ 個/ml 検出結果		
<u>Haemophilus influenzae</u>	ATCC10211	+
<u>Escherichia coli</u>	ATCC25922	—
<u>Enterococcus faecalis</u>	ATCC19433	—
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	ATCC13883	—

まず、Neisseria gonorrhoeae から Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子をクローニングし、同蛋白質の大腸菌での大量発現、精製および同蛋白質の対するモノクローナル抗体を作製した。

Neisseria gonorrhoeae IID821 株（東京大学医科学研究所より分譲、購入）をチョコレート寒天培地上に適当量植菌した後、CO₂ インキュベーター中で 37℃、CO₂ 0.5%条件で 24 時間培養する。生育したコロニーを最終的に 5×10⁹CFU/ml 前後になるように TE Buffer に懸濁する。内約 1.5ml を微量遠心チューブに移し取り 10000rpm で 2 分間遠心し、上澄みを棄てる。沈殿部分を 567μl の TE Buffer に再懸濁する。さらに 30μl の 10%SDS と 3μl の 20mg/ml Proteinase K 溶液を加えて良く混合し、37℃で 1 時間インキュベートする。次に 10%のセチルトリメチルアンモニウムブロマイド/0.7M NaCl 溶液を 80μl 追添しよく混合した後 65℃で 10 分間インキュベートする。次に、体積比 24/1 のクロロホルム-イソアミルアルコール混合液を 700μl 加えよく攪拌する。この溶液を微量遠心機で 12000rpm、5 分間（4℃ コントロール下）遠心処理した後、水層面分を新しい微量遠心管に移す。そこに 0.6 倍量のイソプロパノールを加えチューブをよく振って DNA の沈殿を形成する。白い DNA 沈殿をガラス棒ですくって 1ml の 70%エタノール（-20℃冷却したもの）が入った別の微量遠心管に移す。

次に 10000rpm で 5 分間遠心処理し、上澄みを静かに除去した後さらに 1ml の 70%エタノールを加えて再び 5 分間遠心する。再び上澄みを除去した後沈殿を 100μl の TE Buffer に溶解し DNA 溶液を得た。このゲノム DNA 溶液の濃度を Molecular Cloning, A laboratory manual, 1989, Eds. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., Cold Spring harbor Laboratory Press の E5, Spectrophotometric Determination of the Amount of DNA or RNA に従って定量した。

このゲノム DNA のうち 10ng を用いて PCR を行った。PCR は Taq ポリメラーゼ（宝酒造社製、コード R001A）を用いた。酵素に添付のバッファーを 5μl、酵素に添付の dNTP mixture 4μl と Haemophilus influenzae などの菌の Ribosomal Protein L7/L12 DNA 配列との類似性によりインターネット

PRISM, Ready Reaction Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社製)を用いて行った。0.5ml 容のマイクロチューブに 9.5 μ l の反応ストック液、4.0 μ l の 0.8pmol/ μ l の T7 プロモータープライマー (GIBCO BRL 社製) 及び 6.5 μ l の 0.16 μ g/ μ l のシークエンス用鋳型 DNA を加えて混合し、100 μ l のミネラルオイルを重層後、96°C 30 秒、55°C 15 秒及び 60°C 4 分を 1 サイクルとする PCR 増幅反応を 25 サイクル行い、4°C で 5 分間保温した。反応後、80 μ l の滅菌精製水を加えて攪拌し、遠心分離後、その水層を 3 回のフェノール・クロロホルム抽出を行った。100 μ l の水層に 10 μ l の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) および 300 μ l のエタノールを加えて攪拌後、室温 14000rpm にて 15 分間の遠心を行い沈殿を回収した。沈殿を 75%エタノールで洗浄後、真空下に 2 分間静置して乾燥させ、シークエンス用サンプルとした。シークエンスサンプルは、4 μ l の 10mM の EDTA を含むホルムアミドに溶解して 90°C 2 分間で変性後、氷中で冷却してシークエンスに供した。得られた 5 個のクローンの内 1 個の配列に PCR に用いたプローブと配列の相同性がありさらに他の微生物、例えば Haemophilus influenzae の Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子配列と非常に類似した DNA 配列が見いだされた。その構造遺伝子部分の全塩基配列及び対応するアミノ酸配列は配列表配列番号：21 及び 22 に示すような配列であった。この遺伝子断片は明らかに Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質の遺伝子をコードするものである。

このように構築した Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 GST フュージョン蛋白質発現ベクターを用いて実施例 2 に記載の方法と同様の方法により精製した Neisseria gonorrhoeae の GST フュージョン Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質を取得した。さらに、実施例 3 記載の方法と同様の方法により Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に対するモノクローナル抗体に生産するハイブリドーマ AMGC1 株を取得した。前述のようにして取得した陽性ハイブリドーマ細胞 AMGC1 株を用いて定法にしたがってモノクローナル抗体を生産回収した。

具体的には RPMI1640 培地 (10%FCS 入り) を用いて継代培養した細胞を

分注し 4℃で 1 晩吸着させた。上澄み除去後、1%牛血清アルブミン溶液 (PBS 中) 200 μ l 添加し室温で 1 時間反応しブロッキングする。上澄み除去後洗浄液 (0.02%Tween20、PBS) で洗浄し、その上に AMGC1 抗体の 0.1 から 1 μ g/ml 液 100 μ l を加え室温で 2 時間反応後上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄後、5 μ g/ml の抗マウス IgG のホースラディッシュペルオキシダーゼ標識 (MBL 社製、Code330) 抗体液を 100 μ l 加え室温、1 時間反応を実施し、上澄みを除去しさらに洗浄液で洗浄した後 TMB 溶液 (KPL 社) を 100 μ l ずつ加え室温で 20 分反応、発色後 1N の硫酸を 100 μ l 添加して反応を停止し、450nm の吸光を測定した。

その結果表 6 に示すようにハイブリドーマ AMGC1 由来のモノクローナル抗体を用いた場合、この抗体が Neisseria gonorrhoeae、Haemophilus influenzae 及び Streptococcus pneumoniae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質と反応できることを確認できた。

[表 6]

(AMGC1 抗体と各微生物の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質検出結果)

<u>Neisseria gonorrhoeae</u>	+
<u>Haemophilus influenzae</u>	+
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	+

(+ ; ポジティブ)

ここで取得された AMGC1 抗体はオプティカルイムノアッセイや ELISA で
の微生物検出などいわゆるサンドイッチアッセイ法による微生物検出にお
いて各微生物特異的な抗 Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質抗体と組み合わ
せて用いる抗体として非常に有用である。

[産業上の利用可能性]

本発明によると各種の微生物について同一機能の細胞内分子に対する抗

請求の範囲

1. 微生物のリボソーム蛋白質に対する抗体であって、当該微生物に特異的に反応する抗体。
2. 微生物のリボソーム蛋白質が Ribosomal Protein L7/L12 である、請求の範囲 1 に記載の抗体。
3. 微生物が性行為感染症 (STD、Sexually transmitted disease) 原因微生物である請求の範囲 1 または 2 に記載の抗体。
4. 微生物が呼吸器系感染症原因微生物である請求の範囲 1 または 2 に記載の抗体。
5. 呼吸器系感染症原因微生物が Haemophilus influenzae である請求の範囲 4 に記載の抗体。
6. 呼吸器系感染症原因微生物が Streptococcus pneumoniae である請求の範囲 4 に記載の抗体。
7. 性行為感染症 (STD、Sexually transmitted disease) 原因微生物が Neisseria gonorrhoeae である請求の範囲 3 に記載の抗体。
8. Neisseria gonorrhoeae の Ribosomal Protein L7/L12 蛋白質に対する抗体であって、配列表配列番号：22 のアミノ酸配列において 115 番目のアラニンを含む 5 から 30 アミノ酸の長さの連続する部分アミノ酸配列を認識する抗体であることを特徴とする請求の範囲 7 に記載の抗体。
9. 各種の微生物について同一機能の細胞内分子に対する抗体を用いることを特徴とする微生物検出方法。
10. 各種の微生物について請求の範囲 1 から 8 のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とする微生物検出方法。
11. 各種の微生物について同一機能の細胞内分子に対する抗体を用いることを特徴とする微生物検出用試薬キット。
12. 各種の微生物について請求の範囲 1 から 8 のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とする微生物検出用試薬キット。
13. 遺伝子操作手法によりあるいは微生物からの単離精製により得られ

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> ASAHIKASEI KOGYO KABUSIKI KAISHA

<120> Antibodies for Detecting Microorganisms

<130> ASAHI-2

<150> JP 10/230204

<151> 1998-7-31

<160> 22

<210> 1

<211> 369

<212> DNA

<213> Haemophilus influenzae

<400> 1

atg tca tta act aac gaa caa atc att gaa gcg att gct tca aaa act 48

Met Ser Leu Thr Asn Glu Gln Ile Ile Glu Ala Ile Ala Ser Lys Thr

1 5 10 15

gta act gaa atc gtt gaa tta atc gca gcg atg gaa gaa aaa ttc ggt 96

Val Thr Glu Ile Val Glu Leu Ile Ala Ala Met Glu Glu Lys Phe Gly

20 25 30

gtt tca gca gcg gca gca gta gca gca gct cca gca gca ggc ggt gca 144

Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Pro Ala Ala Gly Gly Ala

35

40

45

gcg gca gca gaa gaa aaa act gaa ttc gac gtt gta ctt aaa tct gca

192

Ala Ala Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Lys Ser Ala

50

55

60

ggt gcg aac aaa gta gca gta att aaa gca gta cgt ggt gca act ggt

240

Gly Ala Asn Lys Val Ala Val Ile Lys Ala Val Arg Gly Ala Thr Gly

65

70

75

80

tta ggc tta aaa gaa gct aaa gat tta gtt gaa tct gct cca gct aac

288

Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Val Glu Ser Ala Pro Ala Asn

85

90

95

tta aaa gaa ggc gtt tct aaa gaa gaa gct gaa gca ctt aag aaa gaa

336

Leu Lys Glu Gly Val Ser Lys Glu Glu Ala Glu Ala Leu Lys Lys Glu

100

105

110

tta gaa gaa gcg ggt gca gaa gta gaa gtt aaa

369

Leu Glu Glu Ala Gly Ala Glu Val Glu Val Lys

115

120

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> Haemophilus influenzae

<400> 2

Met Ser Leu Thr Asn Glu Gln Ile Ile Glu Ala Ile Ala Ser Lys Thr
1 5 10 15
Val Thr Glu Ile Val Glu Leu Ile Ala Ala Met Glu Glu Lys Phe Gly
20 25 30
Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Pro Ala Ala Gly Gly Ala
35 40 45
Ala Ala Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Lys Ser Ala
50 55 60
Gly Ala Asn Lys Val Ala Val Ile Lys Ala Val Arg Gly Ala Thr Gly
65 70 75 80
Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Val Glu Ser Ala Pro Ala Asn
85 90 95
Leu Lys Glu Gly Val Ser Lys Glu Glu Ala Glu Ala Leu Lys Lys Glu
100 105 110
Leu Glu Glu Ala Gly Ala Glu Val Glu Val Lys
115 120

<210> 3

<211> 375

<212> DNA

<213> Helicobacter pylori

<400> 3

atg gca att tca aaa gaa gaa gtg tta gag tat att ggt tca ttg agc
Met Ala Ile Ser Lys Glu Glu Val Leu Glu Tyr Ile Gly Ser Leu Ser
1 5 10 15

48

gtt tta gag ctt tct gaa ttg gtt aaa atg ttt gag gaa aaa ttt ggc 96
Val Leu Glu Leu Ser Glu Leu Val Lys Met Phe Glu Glu Lys Phe Gly
20 25 30

gtg agc gcg act cca acg gtc gta gcg ggt gcg gct gta gct ggc ggt 144
Val Ser Ala Thr Pro Thr Val Val Ala Gly Ala Ala Val Ala Gly Gly
35 40 45

gca gcg gct gag agc gaa gaa aaa acc gaa ttt aat gtg att ttg gcc 192
Ala Ala Ala Glu Ser Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asn Val Ile Leu Ala
50 55 60

gat agc ggt gct gaa aaa att aag gtg att aaa gtg gtt cgt gaa atc 240
Asp Ser Gly Ala Glu Lys Ile Lys Val Ile Lys Val Val Arg Glu Ile
65 70 75 80

act gga ctt ggc ctg aaa gaa gct aaa gac gct acc gaa aaa acc cct 288
Thr Gly Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ala Thr Glu Lys Thr Pro
85 90 95

cat gtg ctt aaa gag ggc gtg aat aaa gaa gaa gct gaa acc atc aag 336
His Val Leu Lys Glu Gly Val Asn Lys Glu Glu Ala Glu Thr Ile Lys
100 105 110

aag aaa ctt gaa gaa gta ggc gct aag gtt gaa gtc aag 375
Lys Lys Leu Glu Glu Val Gly Ala Lys Val Glu Val Lys
115 120 125

<210> 4

<211> 125

<212> PRT

<213> *Helicobacter pylori*

<400> 4

Met Ala Ile Ser Lys Glu Glu Val Leu Glu Tyr Ile Gly Ser Leu Ser

1 5 10 15

Val Leu Glu Leu Ser Glu Leu Val Lys Met Phe Glu Glu Lys Phe Gly

20 25 30

Val Ser Ala Thr Pro Thr Val Val Ala Gly Ala Ala Val Ala Gly Gly

35 40 45

Ala Ala Ala Glu Ser Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asn Val Ile Leu Ala

50 55 60

Asp Ser Gly Ala Glu Lys Ile Lys Val Ile Lys Val Val Arg Glu Ile

65 70 75 80

Thr Gly Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ala Thr Glu Lys Thr Pro

85 90 95

His Val Leu Lys Glu Gly Val Asn Lys Glu Glu Ala Glu Thr Ile Lys

100 105 110

Lys Lys Leu Glu Glu Val Gly Ala Lys Val Glu Val Lys

115 120 125

<210> 5

<211> 366

<212> DNA

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 5

atg gca ttg aac att gaa aac att att gct gaa att aaa gaa gct tca	48
Met Ala Leu Asn Ile Glu Asn Ile Ile Ala Glu Ile Lys Glu Ala Ser	
1 5 10 15	
atc ctt gaa ttg aac gac ctt gta aaa gct atc gaa gaa gaa ttt ggt	96
Ile Leu Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Ile Glu Glu Glu Phe Gly	
20 25 30	
gta act gca gct gct cct gta gct gtt gct gca gct gat gca gct gat	144
Val Thr Ala Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Ala Asp Ala Ala Asp	
35 40 45	
gct ggt gct gct aaa gat tca ttc gac gtt gaa ttg aca tct gca ggc	192
Ala Gly Ala Ala Lys Asp Ser Phe Asp Val Glu Leu Thr Ser Ala Gly	
50 55 60	
gac aaa aaa gtt ggc gtt atc aaa gtt gta cgt gaa atc act ggt ctt	240
Asp Lys Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Glu Ile Thr Gly Leu	
65 70 75 80	
ggt ctt aaa gaa gct aaa gaa ctt gtt gac ggt gca cca gca ctt gtt	288
Gly Leu Lys Glu Ala Lys Glu Leu Val Asp Gly Ala Pro Ala Leu Val	
85 90 95	
aaa gaa ggc gtt gca act gca gaa gct gaa gaa atc aaa gct aaa ttg	336
Lys Glu Gly Val Ala Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ile Lys Ala Lys Leu	
100 105 110	

gaa gaa gct gga gct tca gtt act ctt aaa

366

Glu Glu Ala Gly Ala Ser Val Thr Leu Lys

115

120

<210> 6

<211> 122

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 6

Met Ala Leu Asn Ile Glu Asn Ile Ile Ala Glu Ile Lys Glu Ala Ser

1

5

10

15

Ile Leu Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Ile Glu Glu Glu Phe Gly

20

25

30

Val Thr Ala Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Ala Asp Ala Ala Asp

35

40

45

Ala Gly Ala Ala Lys Asp Ser Phe Asp Val Glu Leu Thr Ser Ala Gly

50

55

60

Asp Lys Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Glu Ile Thr Gly Leu

65

70

75

80

Gly Leu Lys Glu Ala Lys Glu Leu Val Asp Gly Ala Pro Ala Leu Val

85

90

95

Lys Glu Gly Val Ala Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ile Lys Ala Lys Leu

100

105

110

Glu Glu Ala Gly Ala Ser Val Thr Leu Lys

115

120

<210> 7

<211> 369

<212> DNA

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 7

atg gct att act aaa gaa gac att ttg gaa gca gtt ggt tct ttg acc 48
Met Ala Ile Thr Lys Glu Asp Ile Leu Glu Ala Val Gly Ser Leu Thr
1 5 10 15

gta atg gaa ttg aat gac ctg gtt aaa gct ttt gaa gaa aaa ttc ggt 96
Val Met Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Phe Glu Glu Lys Phe Gly
20 25 30

gtt tct gct gct gct gtt gca gtt gca ggt cct gct ggt gcc ggt gct 144
Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Val Ala Gly Pro Ala Gly Ala Gly Ala
35 40 45

gcc gat gct gaa gaa aaa acc gaa ttt gat gtc gtt ttg gct tct gcc 192
Ala Asp Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Ala Ser Ala
50 55 60

ggc gat caa aaa gtc ggc gtg att aaa gtt gtc cgt gca att act ggt 240
Gly Asp Gln Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Ala Ile Thr Gly
65 70 75 80

ttg ggt ctg aaa gaa gct aaa gac atc gtt gac ggc gca cct aaa acc 288
Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ile Val Asp Gly Ala Pro Lys Thr

85

90

95

att aaa gag ggt gtt tct aaa gct gaa gcc gaa gac atc caa aaa caa

336

Ile Lys Glu Gly Val Ser Lys Ala Glu Ala Glu Asp Ile Gln Lys Gln

100

105

110

ctg gaa gca gca ggc gct aaa gtc gaa atc aaa

369

Leu Glu Ala Ala Gly Ala Lys Val Glu Ile Lys

115

120

<210> 8

<211> 123

<212> PRT

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 8

Met Ala Ile Thr Lys Glu Asp Ile Leu Glu Ala Val Gly Ser Leu Thr

1

5

10

15

Val Met Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Phe Glu Glu Lys Phe Gly

20

25

30

Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Val Ala Gly Pro Ala Gly Ala Gly Ala

35

40

45

Ala Asp Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Ala Ser Ala

50

55

60

Gly Asp Gln Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Ala Ile Thr Gly

65

70

75

80

Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ile Val Asp Gly Ala Pro Lys Thr

85

90

95

Ile Lys Glu Gly Val Ser Lys Ala Glu Ala Glu Asp Ile Gln Lys Gln

100

105

110

Leu Glu Ala Ala Gly Ala Lys Val Glu Ile Lys

115

120

<210> 9

<211> 369

<212> DNA

<213> Neisseria meningitidis

<400> 9

atg gct att act aaa gaa gac att ttg gaa gca gtt ggt tct ttg acc

48

Met Ala Ile Thr Lys Glu Asp Ile Leu Glu Ala Val Gly Ser Leu Thr

1

5

10

15

gta atg gaa ttg aac gac ttg gtt aaa gct ttt gaa gaa aaa ttc ggt

96

Val Met Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Phe Glu Glu Lys Phe Gly

20

25

30

gtt tct gct gct gct gtt gca gtt gca ggt cct gct ggt gcc ggt gct

144

Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Val Ala Gly Pro Ala Gly Ala Gly Ala

35

40

45

gcc gat gct gaa gaa aaa acc gaa ttt gat gtc gtt ttg gct tct gcc

192

Ala Asp Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Ala Ser Ala

50

55

60

ggt gat caa aaa gtc ggc gtg att aaa gtt gtc cgt gca att acc ggt

240

Gly Asp Gln Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Ala Ile Thr Gly

65

70

75

80

ttg ggt ctg aaa gaa gct aaa gac atc gtt gac ggt gca cct aaa acc

288

Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ile Val Asp Gly Ala Pro Lys Thr

85

90

95

att aaa gag ggt gtt tct aaa gct gaa gcc gaa gac atc caa aaa caa

336

Ile Lys Glu Gly Val Ser Lys Ala Glu Ala Glu Asp Ile Gln Lys Gln

100

105

110

ctg gaa gaa gcc ggc gct aaa gtc gaa atc aaa

369

Leu Glu Glu Ala Gly Ala Lys Val Glu Ile Lys

115

120

<210> 10

<211> 123

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 10

Met Ala Ile Thr Lys Glu Asp Ile Leu Glu Ala Val Gly Ser Leu Thr

1

5

10

15

Val Met Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Phe Glu Glu Lys Phe Gly

20

25

30

Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Val Ala Gly Pro Ala Gly Ala Gly Ala

35

40

45

Ala Asp Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Ala Ser Ala

50 55 60
Gly Asp Gln Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Ala Ile Thr Gly
65 70 75 80
Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ile Val Asp Gly Ala Pro Lys Thr
85 90 95
Ile Lys Glu Gly Val Ser Lys Ala Glu Ala Glu Asp Ile Gln Lys Gln
100 105 110
Leu Glu Glu Ala Gly Ala Lys Val Glu Ile Lys
115 120

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Haemophilus influenzae からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の取得
に用いた PCR のプライマー DNA。

<400> 11

gtaaggatcc atgtcattaa ctaacgaaca a 31

<210> 12

<211> 34

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Haemophilus influenzae からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の取得
に用いた PCR のプライマー DNA。

<400> 12

agcatctcga gatttaactt ctacttctgc accc 34

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Streptococcus pneumoniae からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の取得
に用いた PCR のプライマー DNA。

<400> 13

ggaaggatcc atggcattga acattgaaaa cat 33

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Streptococcus pneumoniae からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の取得
に用いた PCR のプライマー DNA。

<400> 14

tactctcgag tttaagagta actgaagctc cag 33

<210> 15

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Nisseria gonorrhoeae からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の取得に
用いた PCR のプライマー DNA。

<400> 15

gtaaggatcc atggctatta ctaaagaaga c 31

<210> 16

<211> 34

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Nisseria gonorrhoeae からの Ribosomal Protein L7/L12 遺伝子の取得に
用いた PCR のプライマー DNA。

<400> 16

agcatctcga gatttgattt cgacttttagc gcct 34

<210> 17

<211> 369

<212> DNA

<213> Haemophilus influenzae

<400> 17

atg tca tta act aac gaa caa atc att gaa gcg att gct tca aaa act 48

Met Ser Leu Thr Asn Glu Gln Ile Ile Glu Ala Ile Ala Ser Lys Thr

1 5 10 15

gta act gaa atc gtt gaa tta atc gca gcg atg gaa gaa aaa ttc ggt 96

Val Thr Glu Ile Val Glu Leu Ile Ala Ala Met Glu Glu Lys Phe Gly

20 25 30

gtt tca gca gcg gca gca gta gca gca gct cca gca gca ggc ggt gca 144

Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Pro Ala Ala Gly Gly Ala

35 40 45

gcg gca gca gaa gaa aaa act gaa ttc gac gtt gta ctt aaa tct gca 192

Ala Ala Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Lys Ser Ala

50 55 60

ggc gca aac aaa gta gca gta att aaa gca gta cgt ggt gca act ggt 240

Gly Ala Asn Lys Val Ala Val Ile Lys Ala Val Arg Gly Ala Thr Gly

65 70 75 80

tta ggc tta aaa gaa gct aaa gat tta gtt gaa tct gct cca gct aac 288

Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Val Glu Ser Ala Pro Ala Asn

85 90 95

tta aaa gaa ggc gtt tct aaa gaa gaa gct gaa gca ctt aag aaa gaa 336

Leu Lys Glu Gly Val Ser Lys Glu Glu Ala Glu Ala Leu Lys Lys Glu

100

105

110

tta gaa gaa gcg ggt gca gaa gta gaa gtt aaa

369

Leu Glu Glu Ala Gly Ala Glu Val Glu Val Lys

115

120

<210> 18

<211> 123

<212> PRT

<213> Haemophilus influenzae

<400> 18

Met Ser Leu Thr Asn Glu Gln Ile Ile Glu Ala Ile Ala Ser Lys Thr

1

5

10

15

Val Thr Glu Ile Val Glu Leu Ile Ala Ala Met Glu Glu Lys Phe Gly

20

25

30

Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Pro Ala Ala Gly Gly Ala

35

40

45

Ala Ala Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Lys Ser Ala

50

55

60

Gly Ala Asn Lys Val Ala Val Ile Lys Ala Val Arg Gly Ala Thr Gly

65

70

75

80

Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Val Glu Ser Ala Pro Ala Asn

85

90

95

Leu Lys Glu Gly Val Ser Lys Glu Glu Ala Glu Ala Leu Lys Lys Glu

100

105

110

Leu Glu Glu Ala Gly Ala Glu Val Glu Val Lys

115

120

<210> 19

<211> 366

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 19

atg gca ttg aac att gaa aac att att gct gaa att aaa gaa gct tca 48

Met Ala Leu Asn Ile Glu Asn Ile Ile Ala Glu Ile Lys Glu Ala Ser

1 5 10 15

atc ctt gaa ttg aac gac ctt gta aaa gct atc gaa gaa gaa ttt ggt 96

Ile Leu Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Ile Glu Glu Glu Phe Gly

20 25 30

gta act gca gct gct cct gta gct gtt gct gca gct gat gca gct gat 144

Val Thr Ala Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Ala Asp Ala Ala Asp

35 40 45

gct ggt gct gct aaa gat tca ttc gac gtt gaa ttg aca tct gca ggc 192

Ala Gly Ala Ala Lys Asp Ser Phe Asp Val Glu Leu Thr Ser Ala Gly

50 55 60

gac aaa aaa gtt ggc gtt atc aaa gtt gta cgt gaa atc act ggt ctt 240

Asp Lys Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Glu Ile Thr Gly Leu

65 70 75 80

ggt ctt aaa gaa gct aaa gaa ctt gtt gac ggt gca cca gca ctt gtt 288

Gly Leu Lys Glu Ala Lys Glu Leu Val Asp Gly Ala Pro Ala Leu Val

85

90

95

aaa gaa ggc gtt gca act gca gaa gct gaa gaa atc aaa gct aaa ttg 336

Lys Glu Gly Val Ala Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ile Lys Ala Lys Leu

100

105

110

gaa gaa gct gga gct tca gtt act ctt aaa 366

Glu Glu Ala Gly Ala Ser Val Thr Leu Lys

115

120

<210> 20

<211> 122

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 20

Met Ala Leu Asn Ile Glu Asn Ile Ile Ala Glu Ile Lys Glu Ala Ser

1

5

10

15

Ile Leu Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Ile Glu Glu Glu Phe Gly

20

25

30

Val Thr Ala Ala Ala Pro Val Ala Val Ala Ala Ala Asp Ala Ala Asp

35

40

45

Ala Gly Ala Ala Lys Asp Ser Phe Asp Val Glu Leu Thr Ser Ala Gly

50

55

60

Asp Lys Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Glu Ile Thr Gly Leu

65

70

75

80

Gly Leu Lys Glu Ala Lys Glu Leu Val Asp Gly Ala Pro Ala Leu Val

85

90

95

Lys Glu Gly Val Ala Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ile Lys Ala Lys Leu

100

105

110

Glu Glu Ala Gly Ala Ser Val Thr Leu Lys

115

120

<210> 21

<211> 369

<212> DNA

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 21

atg gct att act aaa gaa gac att ttg gaa gca gtt ggt tct ttg acc

48

Met Ala Ile Thr Lys Glu Asp Ile Leu Glu Ala Val Gly Ser Leu Thr

1

5

10

15

gta atg gaa ttg aat gac ctg gtt aaa gct ttt gaa gaa aaa ttc ggt

96

Val Met Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Phe Glu Glu Lys Phe Gly

20

25

30

gtt tct gct gct gct gtt gca gtt gca ggt cct gct ggt gcc ggt gct

144

Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Val Ala Gly Pro Ala Gly Ala Gly Ala

35

40

45

gcc gat gct gaa gaa aaa acc gaa ttt gat gtc gtt ttg gct tct gcc

192

Ala Asp Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Ala Ser Ala

50

55

60

ggc gat caa aaa gtc ggc gtg att aaa gtt gtc cgt gca att act ggt 240

Gly Asp Gln Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Ala Ile Thr Gly

65 70 75 80

ttg ggt ctg aaa gaa gct aaa gac atc gtt gac ggc gca cct aaa acc 288

Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ile Val Asp Gly Ala Pro Lys Thr

85 90 95

att aaa gag ggt gtt tct aaa gct gaa gcc gaa gac atc caa aaa caa 336

Ile Lys Glu Gly Val Ser Lys Ala Glu Ala Glu Asp Ile Gln Lys Gln

100 105 110

ctg gaa gca gca ggc gct aaa gtc gaa atc aaa 369

Leu Glu Ala Ala Gly Ala Lys Val Glu Ile Lys

115 120

<210> 22

<211> 123

<212> PRT

<213> Neisseria gonorrhoeae

<400> 22

Met Ala Ile Thr Lys Glu Asp Ile Leu Glu Ala Val Gly Ser Leu Thr

1 5 10 15

Val Met Glu Leu Asn Asp Leu Val Lys Ala Phe Glu Glu Lys Phe Gly

20 25 30

Val Ser Ala Ala Ala Val Ala Val Ala Gly Pro Ala Gly Ala Gly Ala

35 40 45
Ala Asp Ala Glu Glu Lys Thr Glu Phe Asp Val Val Leu Ala Ser Ala
50 55 60
Gly Asp Gln Lys Val Gly Val Ile Lys Val Val Arg Ala Ile Thr Gly
65 70 75 80
Leu Gly Leu Lys Glu Ala Lys Asp Ile Val Asp Gly Ala Pro Lys Thr
85 90 95
Ile Lys Glu Gly Val Ser Lys Ala Glu Ala Glu Asp Ile Gln Lys Gln
100 105 110
Leu Glu Ala Ala Gly Ala Lys Val Glu Ile Lys
115 120

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04122

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07K16/12, C12P21/08, C12N15/00, C12Q1/04, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07K16/12, C12P21/08, C12N15/00, C12Q1/04, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Jan Kolberg, et al., "Monoclonal antibodies against streptococcus pneumoniae detect epitopes on eubacterial ribosomal proteins L7/L12 and on streptococcal elongation factor Ts" Microbiology, Vol. 143, No. 1, (1997) P.55-61	1, 2, 4, 6/ 3, 5, 7, 9-13
Y	Sergyl Lafont, et al., "Induction of Murine B Cell Proliferation and Immunoglobulin Synthesis by Some Bacterial Ribosomes" Microbiol. Immunol., Vol. 32, No. 10, (1988) P.1043-1058	5, 9-13
Y	Kita E, et al., "ANALYSIS OF IMMUNE RESPONSES IN GENITAL TRACTS OF MICE IMMUNIZED WITH PURIFIED RIBOSOMAL FRACTIONS NEISSERIA-GONORRHOEAE" British Journal of Venereal Disease, Vol. 60, No. 4, (1984) P.219-225	3, 7, 9-13
Y	JP, 64-500083, A (Washington Research Foundation), 19 January, 1989 (19. 01. 89) & WO, 8706617, A & EP, 264434, A	9-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
26 October, 1999 (26. 10. 99)Date of mailing of the international search report
16 November, 1999 (16. 11. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/04122

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C 07 K 16 / 12, C 12 P 21 / 08, C 12 N 15 / 00, C 12 Q 1 / 04, G 01 N 33 / 53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C 07 K 16 / 12, C 12 P 21 / 08, C 12 N 15 / 00, C 12 Q 1 / 04, G 01 N 33 / 53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	Jan Kolberg, et al, "Monoclonal antibodies against streptococcus pneumoniae detect epitopes on eubacterial ribosomal proteins L7/L12 and on streptococcal elongation factor Ts" Microbiology, Vol. 143, No. 1, (1997) P. 55-61	1, 2, 4, 6/ 3, 5, 7, 9-13
Y	Sergyl Lafont, et al, "Induction of Murine B Cell Proliferation and Immunoglobulin Synthesis by Some Bacterial Ribosomes" Microbiol. Immunol., Vol. 32, No. 10, (1988) P. 1043-1058	5, 9 - 13

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 10. 99

国際調査報告の発送日

16.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齋藤 真由美

4 B

8 9 3 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

PCT

EP US

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 ASAHI-2	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04122	国際出願日 (日.月.年) 30.07.99	優先日 (日.月.年) 31.07.98
出願人(氏名又は名称) 旭化成工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C 07 K 16/12, C 12 P 21/08, C 12 N 15/00, C 12 Q 1/04, G 01 N 33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C 07 K 16/12, C 12 P 21/08, C 12 N 15/00, C 12 Q 1/04, G 01 N 33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	Jan Kolberg, et al, "Monoclonal antibodies against streptococcus pneumoniae detect epitopes on eubacterial ribosomal proteins L7/L12 and on streptococcal elongation factor Ts" Microbiology, Vol. 143, No. 1, (1997) P. 55-61	1, 2, 4, 6/ 3, 5, 7, 9-13
Y	Sergyl Lafont, et al, "Induction of Murine B Cell Proliferation and Immunoglobulin Synthesis by Some Bacterial Ribosomes" Microbiol. Immunol., Vol. 32, No. 10, (1988) P. 1043-1058	5, 9-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 10. 99

国際調査報告の発送日

16.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齋藤 真由美



4 B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Kita E, et al, "ANALYSIS OF IMMUNE RESPONSES IN GENITAL TRACTS OF MICE IMMUNIZED WITH PURIFIED RIBOSOMAL FRACTIONS NEISSERIA-GONORRHOEAE" British Journal of Venereal Disease, Vol. 60, No. 4, (1984) P. 219-225	3, 7, 9-13
Y	JP, 64-500083, A (ワシントン リサーチ ファウンデーション) 19.1月.1989 (19.01.89) & WO, 8706617, A & EP, 264434, A	9-13



特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

旭化成工業株式会社

代表取締役

山本 一元

寄託者

あて名 〒

殿

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号



1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) AMSP-2	(受託番号) FERM BP- 6807
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 ■ 科学的性質 ■ 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 11 年 7 月 28 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日 に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Advanced Industrial Science and Human-Technology 名称: Agency of Industrial Science and Technology 所長 大箸 信一 Dr. Shinichi Oshiki Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305-8566) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN 平成 11 年 (1999) 7 月 28 日	

(TRANSLATION)

INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY
AUTHORITY identified at the bottom of this page.

TO DEPOSITOR:

Name: ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA
Representative: Kazumoto YAMAMOTO
2-6, Dojimahama 1-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka
530-8205 Japan

I. IDENTIFICATION OF MICROORGANISM	
Identification Reference Give by the Depositor: AMSP-2	Accession Number: FERM BP-6807
II. A SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC POSITION	
The microorganism identified under I above was accompanied by a document stating the following item(s). <input type="checkbox"/> A Scientific Property <input type="checkbox"/> Taxonomic position	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This authority accepts the microorganism identified under I above, which was received On July 28, 1999	
IV. RECEIPT OF TRANSFER	
This authority received the microorganism identified under I above on _____ and the request for the transfer to the deposit based on the Budapest Treaty on _____ (It was transferred from _____ which was deposited on _____).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial, Science and Technology Ministry of International Trade and Industry Representative: Dr. Shinichi Ohashi, Director-General Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN Date: July 28, 1999	